

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年7月15日 (15.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/058984 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 19/28, C08B 37/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016523
- (22) 国際出願日: 2003年12月24日 (24.12.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-373213 2002年12月24日 (24.12.2002) JP
特願2003-202708 2003年7月28日 (28.07.2003) JP

市川内町加賀須野463 大塚化学株式会社研究技術センター内 Tokushima (JP).

(74) 代理人: 田村 巖 (TAMURA, Iwao); 〒561-0872 大阪府豊中市 寺内1丁目9番22号 田村特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚化学株式会社 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒540-0021 大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号 Osaka (JP).

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 梶原 康宏 (KAJIHARA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒224-0014 神奈川県横浜市都筑区 牛久保東2-4-2 05 Kanagawa (JP).(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 掛樋 一晃 (KAKEHI, Kazuaki) [JP/JP]; 〒630-8113 奈良県奈良市 法蓮町北1-1 226 Nara (JP). 深江 一博 (FUKAE, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒771-0193 徳島県 徳島添付公開書類:
一 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SUGAR CHAIN ASPARAGINE DERIVATIVES, SUGAR CHAIN ASPARAGINE, SUGAR CHAIN, AND PROCESSES FOR PRODUCING THESE

(54) 発明の名称: 糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖ならびにそれらの製造法

(57) Abstract: An asparagine derivative of an α -2,3-linked sugar chain having 11 to 7 monosaccharide units; an asparagine derivative of an α -2,6-linked sugar chain having fluorinated 11 to 7 monosaccharide units; and a sugar chain asparagine derivative which comprises a sugar chain asparagine in which the amino-group nitrogen of the asparagine has been protected by a lipid-soluble protective group and the N-acetylglucosamine on the non-reducing end side contains at least one fucose.(57) 要約: 11~7糖を有する α 2,3糖鎖アスパラギン誘導体、フッ素を含む11~7糖を有する α 2,6糖鎖アスパラギン誘導体、及び脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体、並びにこれらの製造方法。

WO 2004/058984 A1

明 細 書

糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖ならびにそれらの製造法

5 技術分野

本発明は糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖ならびにそれらの製造法に関する。

また本発明はフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体およびその製造方法に関する。

10

背景技術

近年、核酸（DNA）、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されてきている。ヒトの体は、約60兆個の細胞から成っている一大細胞社会であり、全ての細胞表面は糖鎖分子によって覆われている。例えば、AB

15 O型血液型は細胞表面の糖鎖の違いにより決定されている。

糖鎖は、細胞間の認識や相互作用に関わる働きをもち、細胞社会を成り立たせる要となっている。細胞社会の乱れは、癌、慢性疾患、感染症、老化などにつながる。

例えば、細胞が癌化すると糖鎖の構造変化が起こることが分かっている。また、
20 コレラ菌やインフルエンザウイルスなどは、ある特定の糖鎖を認識し結合することにより、細胞に侵入し感染することが知られている。

糖鎖機能の解明は、新しい原理に基づく医薬品や食品の開発などをもち、病気の予防、治療に貢献するなど、幅広い応用が期待されている。

糖鎖は単糖の配列、結合様式・部位、鎖の長さ・分岐様式、全体の高次構造な

どの多様性から、核酸やタンパク質の構造と比べると非常に複雑な構造である。従って、その構造に由来する生物学的な情報は核酸やタンパク質に比べて多種多様である。糖鎖は、研究の重要性を認識されながらも、その構造の複雑さや多様性により、核酸やタンパク質に比べて研究の推進が遅れている状況にある。

- 5 上記のように細胞膜表面や血清などに存在するタンパク質の多くは糖鎖が結合している。糖鎖がタンパク質に共有結合した分子は糖タンパク質とよばれ、糖とタンパク質との結合様式の違いから2つのグループに分けることができる。一つはアスパラギン (A s n) の側鎖のアミノ基と糖鎖が結合したアスパラギン結合型糖鎖 (N-グリコシド結合型) である。もう一方はセリン (S e r) やトレオニン (T h r) のアルコールに糖鎖が結合したムチン結合型糖鎖 (O-グリコシド結合型) である。すべてのアスパラギン結合型糖鎖は5つの糖残基からなる基本骨格をもち、結合する糖鎖の非還元末端の糖残基の種類によって高マンノース型、複合型、混成型のサブグループに分類される。一方ムチン結合型糖鎖は基本骨格 (コア) の違いから4グループに分類される。

- 15 このように糖鎖は重要な化合物ではあるが、糖鎖の絶対量の不足がある。糖鎖を得る手段として、生体内に存在する糖タンパク質から糖鎖だけを遊離させる方法がある。しかし糖タンパク質から糖鎖を大量に切り出すのは、困難であり、生体内には構造が酷似した糖鎖が多く存在し、単一の糖鎖のみを大量に得るのは難しい。また、生体内に存在しない糖鎖は、大量に入手するのは困難である。
- 20 本発明の課題は、少なくとも1種以上のシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を非還元末端に含む新規な糖鎖アスパラギン誘導体とその製造方法を提供することにある。

- また本発明の課題は、少なくとも1種以上のシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を非還元末端に含む新規な糖鎖アスパラギンとその製造方法を提供することにある。
- 25 ある。

また本発明の課題は、少なくとも1種以上のシアル酸あるいはシアル酸の誘導

体を非還元末端に含む新規な糖鎖とその製造方法を提供することにある。

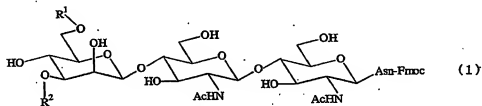
本発明の課題は、脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む新規な糖鎖アスパラギン誘導体とその製造方法を提供する

5 ことにある。

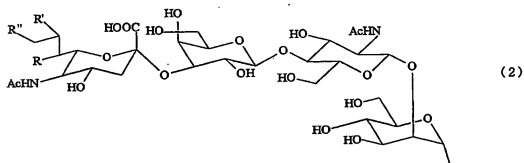
発明の開示

本発明は、下記の発明に係る。

1. 式(1)で表される11~7糖を有する α 2,3糖鎖アスパラギン誘導体及
10 びその製造法。



[式中、 R^1 および R^2 は、水素原子、式(2)~(5)で示される基であり、
同一でも異なってもよい。ただし、 R^1 および R^2 の一方は必ず式(2)で
15 示される基である。]

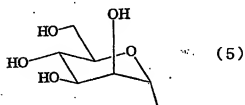
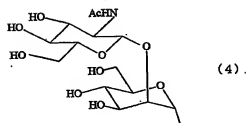
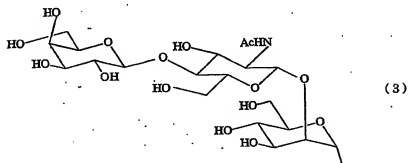


R , R' , R'' は下記の組合せを示す。

4

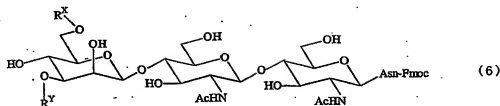
- (a) $R=F$, $R'=OH$, $R''=OH$
 (b) $R=OH$, $R'=F$, $R''=OH$
 (c) $R=OH$, $R'=OH$, $R''=F$
 (d) $R=OH$, $R'=OH$, $R''=OH$

5

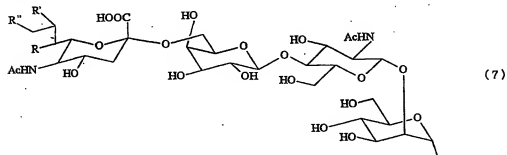


10

2. 式(6)で表されるフッ素を含む11~7糖を有する α 2,6糖鎖アスパラギン誘導体及びその製造法。



[式中、 R^X および R^Y は、水素原子、式(7)で示される基、または式(3)～(5)で示される基である。ただし、 R^X および R^Y の一方は必ず式(7)で示される基である。]



5

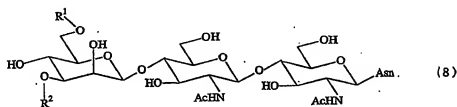
R , R' , R'' は下記の組合せを示す。

(a) $R = F$, $R' = OH$, $R'' = OH$

(b) $R = OH$, $R' = F$, $R'' = OH$

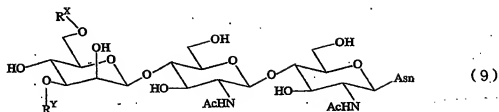
(c) $R = OH$, $R' = OH$, $R'' = F$

10 3. 式(8)で表される11～7糖を有する α 2,3糖鎖アスパラギン及びその製造法。



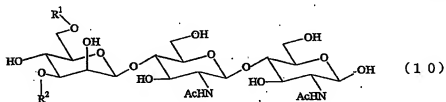
[式中、 R^1 および R^2 は上記に同じ。]

4. 式(9)で表されるフッ素を含む11～7糖を有する α 2,6糖鎖アスパラ
15 ギン及びその製造法。



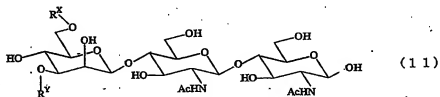
〔式中、 R^X および R^Y は上記に同じ。〕

5. 式(10)で表される11~7糖を有する α 2,3糖鎖及びその製造法。



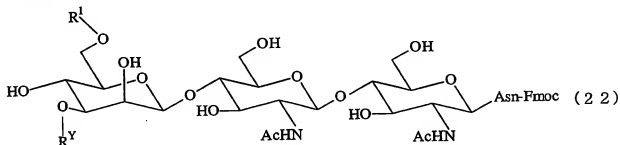
5 〔式中、 R^1 および R^2 は上記に同じ。〕

6. 式(11)で表されるフッ素を含む11~7糖を有する α 2,6糖鎖及びその製造法。

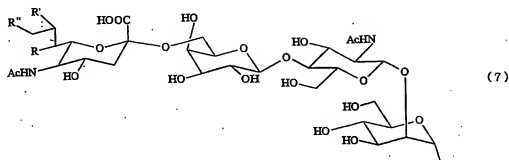


〔式中、 R^X および R^Y は上記に同じ。〕

10 7. 式(22)で表される11糖を有する(α 2,3)(α 2,6)糖鎖アスパラギン誘導体。



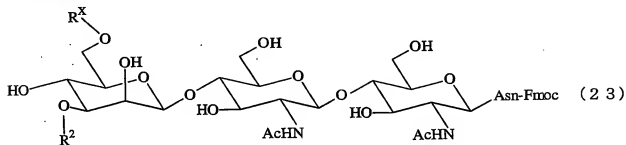
〔式中、 R^1 は式(2)で示される基であり、 R^Y は下記式(7)で示される基である。〕



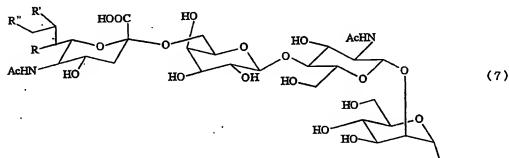
R, R', R'' は下記の組合せを示す。

- (a) R=F, R'=OH, R''=OH
 5 (b) R=OH, R'=F, R''=OH
 (c) R=OH, R'=OH, R''=F
 (d) R=OH, R'=OH, R''=OH

8. 式(23)で表される11糖を有する(α2,3)(α2,6)糖鎖アスパラギン誘導体。



- 10 [式中、R²は式(2)で示される基であり、R^Xは下記式(7)で示される基である。]



R, R', R'' は下記の組合せを示す。

- (a) $R=F$, $R'=OH$, $R''=OH$
- (b) $R=OH$, $R'=F$, $R''=OH$
- (c) $R=OH$, $R'=OH$, $R''=F$
- (d) $R=OH$, $R'=OH$, $R''=OH$

- 5 本発明は、脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体、およびその製造方法に係る。

- 本発明者は、先に特願2001-185685号（以下、先願という）において、種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖の製造方法、更には糖残基が任意に欠失した糖鎖が結合した新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖を開発した。
- 10

この先願の方法は例えば

- (1) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、
- 15

ならびに

- (b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、
- 20
- を含む、糖鎖アスパラギン由来の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(2) (b') 工程(b)で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程をさらに含む前記(1)記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

- 25 (3) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式(A)の化合物および/または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化

物を含むものである、前記（１）または（２）記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

（４） 脂溶性の保護基がフルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）基である前記（１）～（３）いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

- 5 （５） 工程（ａ）が、非還元末端にシアル酸残基を有する１種もしくは２種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記（１）～（３）いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

- 10 （６） （ａ）１種もしくは２種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

（ｂ）該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグ

- 15 ラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、ならびに

（ｃ）工程（ｂ）で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、

を含む、糖鎖アスパラギンの製造方法、

- （７） （ｂ'）工程（ｂ）で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および／または

- 20 （c'）工程（c）で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、

をさらに含む、前記（６）記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

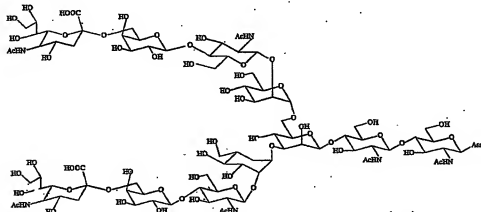
（８） １種もしくは２種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式

- 25 （A）の化合物および／または該化合物において１以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記（６）または（７）記載の糖鎖アスパラギンの製造方

法、

(9) 脂溶性の保護基がFmoc基である前記(6)～(8)いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

- 5 (10) 工程(a)が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記(6)～(8)いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法などである。



(A)

- 10 これら糖鎖アスパラギン誘導体及び糖鎖アスパラギンの製造についての詳細は、上記先願に述べられているので、これを引用する。しかし若干先願の内容について述べると、先願の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、たとえば、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖アスパラギン、好ましくはアスパラギン結合型糖鎖から得られる糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性
- 15 の保護基を導入(結合)して糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を得た後に当該混合物を各糖鎖アスパラギン誘導体に分離することを1つの大きな特徴とする。なお、本明細書において、「糖鎖アスパラギン」とはアスパラギンが結合した状態の糖鎖をいう。また、「アスパラギン結合型糖鎖」とはタンパク質のポリペプチド中のアスパラギン(Asn)の酸アミノ基に、還元末端に存在するN-アセチ
- 20 ルグルコサミンがN-グリコシド結合した糖鎖群であって、Man(β1-4)

GlcNAc ($\beta 1-4$) GlcNAcを母核とする糖鎖群をいう。「糖鎖アスパラギン誘導体」とはアスパラギン残基に脂溶性の保護基が結合した状態の糖鎖アスパラギンをいう。また、化合物の構造式中、「AcHN」はアセトアミド基を示す。

- 5 前記するように、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖は非還元末端の糖残基がランダムに欠失した糖鎖の混合物である。本発明者らは、意外にも天然の糖タンパク質に由来する糖鎖、具体的には糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入することで、当該保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を公知のクロマトグラフィーの手法を用いて容易
- 10 に個々の糖鎖アスパラギン誘導体に分離することができることを見出した。それにより、種々の構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ大量に調製することが可能となった。たとえば、従来分離が困難であった類似構造の糖鎖アスパラギン誘導体同士の分離が可能となり、それらの化合物を各々、容易かつ大量に調製することができる。また、得られた糖鎖アスパラギン誘導体を元に、たとえ
- 15 ば、糖加水分解酵素を順次作用させて糖残基を除去することにより、さらに様々な糖鎖アスパラギン誘導体を合成することもできる。

- このように、糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して誘導体化することにより個々の糖鎖アスパラギン誘導体の分離が可能となったが、これは、脂溶性の保護基を導入したことにより糖鎖アスパラギン誘導体の全体の脂溶性が高まり、
- 20 たとえば、好適に使用される逆相系カラムとの相互作用が格段に向上し、その結果、より鋭敏に糖鎖構造の差を反映して個々の糖鎖アスパラギン誘導体が分離されるようになったことによると考えられる。

- さらに、先願によれば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することにより種々の糖鎖アスパラギンを、人工的に容易かつ大量に得ることができ
- 25 る。

しかし、上記先願で得られる糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び

糖鎖はいずれも α 2, 6結合体のものであった。

また、上記先願で得られる糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び糖鎖はいずれもフコースが結合していない糖鎖アスパラギン誘導体であった。

- 本発明では、上記先願に記載のない α 2, 3結合体の糖鎖アスパラギン誘導体、
- 5 糖鎖アスパラギン及び糖鎖、並びに α 2, 6結合体のものに更にフッ素を含む、
いずれも新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び糖鎖を得るものである。

また本発明では、上記先願に記載のないフコース結合体の糖鎖アスパラギン誘導体を得るものである。

- 10 ここで、 α 2, 3結合体と α 2, 6結合体の相異について以下に説明する。

α 2, 3結合体、 α 2, 6結合体とは、シアル酸とガラクトースとの結合様式を表わすものである。前者は、シアル酸の2位の炭素と、ガラクトースの3位の炭素が α 結合しているものをいい、後者は、シアル酸の2位の炭素と、ガラクトースの6位の炭素が α 結合しているものをいう。これらは、ガラクトースとの結合

- 15 炭素の違いではある。

しかしながらこの違いは、例えば、インフルエンザウイルスは、シアル酸を末端に持つ糖鎖をレセプターとして認識している。しかし、ヒトとトリのインフルエンザウイルスではレセプター特異性が異なっている。前者は、シアル酸がガラクトースに α 2, 6結合した糖鎖を、後者はシアル酸がガラクトースに α 2, 3結合した糖鎖を特異的に認識する。シアル酸-ガラクトース間の結合様式の違い、

20 さらにシアル酸の相違が、インフルエンザウイルスの宿主域の制限に大きな役割を果たしていることが知られている。

本発明では、このように先願には記載のない新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び糖鎖、並びにそれらの製造法に係るものである。

- 25 本発明の方法においては先ず、出発化合物である脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギン（9糖-Asn-Fmoc）をシアル酸転移酵素を用いてシア

ル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離し、脂溶性の保護基で保護されたジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体および2種のモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体が得られる。

- 5 次いで、得られたジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体および2種のモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解することにより、シアル酸あるいはシアル酸誘導体を有する9～7糖鎖アスパラギン誘導体を得られる。

- また、上記で得られた11～7糖鎖アスパラギン誘導体やジシアロ糖鎖アスパラギン(α 2,6-11糖-Asn-Fmoc)を出発原料としそれを糖加水分解することにより得られる10～6糖鎖アスパラギン誘導体に、糖転移酵素によりフコースを転移することによりフコースを含む13～7糖鎖アスパラギン誘導体
- 10 体が得られる。

- 当該保護基としては特に限定されるものではなく、例えば、Fmoc基やtert-ブチルオキシカルボニル(Boc)基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル基、アセチル基等の、カーボネート系またはアミド系の保護基等を使用
- 15 することができる。得られた糖鎖アスパラギン誘導体を直ちに所望の糖ペプチドの合成に使用できるという観点から、当該保護基としては、Fmoc基またはBoc基などが好ましく、Fmoc基がより好ましい。Fmoc基はシアル酸等比較的酸性条件に不安定な糖が糖鎖に存在する場合に特に有効である。また、保護
- 20 基の導入は公知の方法(たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照)に従って行えばよい。

- たとえば、Fmoc基を用いる場合、糖鎖アスパラギンに対しアセトンを適量加えた後、さらに9-フルオレニルメチル-N-スクシニミドカルボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて溶解し、25℃にてアスパラギン残基へのFmoc
- 25 基の結合反応を行うことにより、当該糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基にF

m o c基を導入することができる。

以上の操作により、脂溶性の保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体が得られる。

シアル酸としては、一般に市販されているシアル酸あるいは化学合成したもの
5 を用いることができる。

シアル酸の誘導体としては、一般に市販されているシアル酸の誘導体あるいは
化学合成したものを用いることができる。具体的には、シアル酸の7位、8位あ
るいは9位の炭素に結合している水酸基を水素原子あるいはハロゲン原子で置換
したものを挙げることができる。ハロゲン原子としては、フッ素、塩素、臭素等
10 を挙げることができるが、好ましくはフッ素がよい。

シアル酸転移酵素としては、一般に市販されているもの、天然由来のもの、遺
伝子組換えにより生産されたものを用いることができ、転移させるシアル酸ある
いはシアル酸の誘導体の種類により適宜選択することができる。具体的には、 α
2, 3転移酵素であるRat Recombinant由来のもの、 α 2, 6転移
15 酵素であるRat Liver由来のものを挙げるができる。また、シアリ
ターゼをもちいてpH調整等により平衡をずらすことにより、シアル酸あるいは
シアル酸の誘導体を転移させてもよい。

上記糖鎖アスパラギン誘導体のクロマトグラフィーによる分離は、適宜、公知
のクロマトグラフィーを単独または複数組み合わせ用いることにより行うこ
20 とができる。

たとえば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物をゲル濾過カラムクロマト
グラフィーで精製後、HPLCを用いて精製する。HPLCにおいて用い得るカ
ラムとしては逆相系のカラムが好適であり、たとえば、ODS、Phenyl系、
ニトリル系や、陰イオン交換系のカラム、具体的には、たとえば、ファルマシア
25 社製モノQカラム、イヤترون社製イアトロビーズカラムなどが利用可能である。
分離条件等は適宜、公知の条件を参照して調整すればよい。以上の操作により、

糖鎖アスパラギン誘導体混合物から所望の各糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

- 5 以上の操作により、たとえば、保護基がFmoc基である場合、式(12)、(13)、(17)、(18)、(22)、(23)の糖鎖アスパラギン誘導体を単独又は混合物の形で得ることができる。

- 次に、上記で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解することにより、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。たとえば、糖鎖アスパラギン誘導体を分離する段階においては混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体の種類を制限して糖鎖アスパラギン誘導体を大まかに分離し、次いで加水分解、たとえば、糖加水分解酵素を用いて加水分解することにより所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。なお、加水分解は前記と同様に行うことができる。特に、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をより効率的に得る観点から、糖残基の切断様式が明確な糖加水分解酵素を用いて加水分解するのが好ましい。

- 15 たとえば、ガラクトース残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってガラクトース加水分解酵素を用いてガラクトース残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いるガラクトース加水分解酵素は
- 20 市販されている公知のエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：1
- 25 8）で行うのが好ましい。

- N-アセチルグルコサミン残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってN-アセチルグルコサミン加水分解酵素を用いてN-アセチルグルコサミン残基の切断反応を行うことにより成し得る。また、N-アセチルヘキ
- 5 ソサミニダーゼ加水分解酵素を用いてもよい。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いる各酵素は市販されているエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が
- 10 切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：メタノール＝65：35または50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：18）で行うのが好ましい。
- 15 マンノース残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってマンノース加水分解酵素を用いてマンノース残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いるマンノース加水分解酵素は市販されているエキ
- 20 ソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は、10～
- 25 200mM程度の酢酸アンモニウムなどの緩衝溶液とアセトニトリル、あるいはエタノール、あるいはメタノール、あるいはブタノール、あるいはプロパノール

などの脂溶性のある水溶性有機溶剤を適宜混ぜて用いることができる。ここに例示する場合、展開溶媒としては50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：18が好適である）で行うのが好ましい。

- このようにして得られた各糖鎖アスパラギン誘導体を得た後、フコースを転移
- 5 させることにより本発明の脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む新規な糖鎖アスパラギン誘導体を製造することができる。

- フコースとしては、一般に市販されているフコースあるいは化学合成したものを
- 10 を用いることができる。

- フコース転移酵素としては、一般に市販されているもの、天然由来のもの、遺伝子組換えにより生産されたものを用いることができ、転移させるフコースの種類により適宜選択することができる。具体的には、糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンにフコースを転移させる酵素である
- 15 Fucosyltransferase V (Human, Recombinant、血漿由来、血清由来、乳汁由来、肝臓由来)などを挙げることができる。また、フコース加水分解酵素を用いてpH調整等により平衡ずらすことにより、フコースを転移させてもよい。

- 上記糖鎖アスパラギン誘導体のクロマトグラフィーによる分離は、適宜、公知のクロマトグラフィーを単独でまたは複数組合せて用いることにより行うことができる。
- 20 できる。

- たとえば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製後、HPLCを用いて精製する。HPLCにおいて用い得るカラムとしては逆相系のカラムが好適であり、たとえば、ODS、Phenyl系、ニトリル系や、陰イオン交換系のカラム、具体的には、たとえば、ファルマシア
- 25 社製モノQカラム、イヤトロン社製イアトロピーズカラムなどが利用可能である。分離条件等は適宜、公知の条件を参照して調整すればよい。以上の操作により、

糖鎖アスパラギン誘導体混合物から所望の各糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

このように、各糖鎖アスパラギン誘導体を得た後、さらに各種糖加水分解酵素等を用いて当該誘導体を加水分解し、糖鎖の非還元末端の糖残基を除去することにより、たとえば、糖鎖の末端の分岐構造が不均一な様々な糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ単一化合物として得ることができる。また、種々の糖加水分解酵素を用い、加水分解する順番やその種類を変えることで、より多くの種類の糖鎖アスパラギン誘導体を製造することができる。

従来の方法によれば、極限られた糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を分析スケールで得るのにさえ膨大な時間とコストが必要であったが、本発明によれば、特別の装置や試薬を必要とすることなく、慣用のゲルろ過カラム、HPLCカラムや、少なくとも3種類の糖加水分解酵素（たとえば、ガラクトース加水分解酵素、マンノース加水分解酵素、N-アセチルグルコサミン加水分解酵素）等を使って、2週間程度で所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を1グラム程度調製することが可能である。

以上の操作により、たとえば、保護基がFmoc基である場合、式(14)～(16)、(19)～(21)の糖鎖アスパラギン誘導体を単独又は混合物の形で得ることができる。

また本発明は、種々の単離された糖鎖アスパラギンを大量に得ることができる糖鎖アスパラギンの製造方法を提供する。当該方法は、前記糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法に従う糖鎖アスパラギン誘導体の製造工程に続き、さらに、得られた糖鎖アスパラギン誘導体から保護基を除去する工程を含むものである。

糖鎖アスパラギン誘導体からの保護基の除去は、公知の方法に従って行うことができる（たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）。たとえば、保護基がFmoc基である場合、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)中、糖鎖アス

- パラギン誘導体にモルホリンを加えて反応を行うことによりFmoc基を除去することができる。また、Boc基は弱酸を反応させることで除去することができる。保護基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製することにより、糖鎖アスパラギンを得てもよい。

以上の操作により、たとえば、式(8)、(9)の糖鎖アスパラギンを単独又は混合物の形で得ることができる。

- さらに本発明は、種々の単離された糖鎖を大量に得ることができる糖鎖の製造方法を提供する。当該方法は、前記糖鎖アスパラギンの製造方法に従う糖鎖アスパラギンの製造工程に続き、さらに、得られた糖鎖アスパラギンからアスパラギン残基を除去する工程を含むものである。

- 糖鎖アスパラギンからのアスパラギン残基の除去は、公知の方法に従って行うことができる。たとえば、糖鎖アスパラギンを無水ヒドラジンと反応させた後、アセチル化することによりアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。
- また、糖鎖アスパラギンを塩基性水溶液で加熱還流後、アセチル化することによってもアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。アスパラギン残基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製してもよい。
- 以上の操作により、たとえば、式(10)、(11)の糖鎖を単独又は混合物の形で得ることができる。

このように、本発明によれば、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖(以下、3つ併せて糖鎖類という場合がある)を安価かつ効率的に大量に製造することができる。

- かかる糖鎖類は医薬品開発等の分野において非常に有用である。たとえば、医薬品開発における応用例としては、たとえば、ガンのワクチン合成があげられる。

細胞がガン化すると体内にはなかった糖鎖が発現することが知られている。また、当該糖鎖を化学的に合成し、ワクチンとして個体に投与すると、ガンの増殖が抑制されることも知られている。そこで、本発明により所望の糖鎖類を製造することができれば、ガンの治療に有効なワクチンの合成を行うことが可能である。また、本発明により得られる糖鎖類を、さらに化学的な反応および糖転移酵素による反応などを組み合わせて新たな糖残基を結合させて誘導体化し、新規なワクチンの合成を行うことも可能である。

発明を実施するための最良の形態

- 10 以下に参考例、実施例を挙げて説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるものではない。

参考例1 α 2, 6-ジシアロ糖鎖アスパラギンの合成

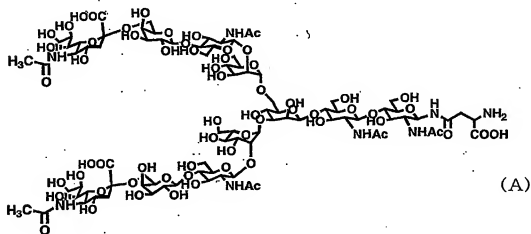
- 卵由来粗精製SGP（シアリルグリコペプチド）2.6gをトリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液（TRIZMA BASE 0.05mol/l、塩化カルシウム0.01mol/l、pH7.5）100mlに溶解させた。これにアジ化ナトリウム58mg（772 μ mol）とアクチナーゼ-E（科研製薬社製）526mgを加え、37℃で静置した。65時間後、再びアクチナーゼ-Eを263mg加え、更に37℃で24時間静置した。この溶液を凍結乾燥した後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー（Sephadex G-25、2.5 ϕ ×1m、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min）で2回精製し、 α 2, 6-ジシアロ糖鎖アスパラギンを1.3g（555 μ mol）得た。

得られたジシアロ糖鎖アスパラギンの物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30℃)

- δ 5.13 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man4-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H, J=7.6 Hz,

- GlcNAc 2-H-1), 4.60 (d, 2H, $J=7.6\text{ Hz}$, GlcNAc
 5, 5-H-1), 4.44 (d, 2H, $J=8.0\text{ Hz}$, Gal 6, 6-H-
 1), 4.25 (bd, 1H, Man 3-H-2), 4.20 (bdd, 1H,
 Man 4-H-2), 4.12 (bd, 1H, Man 4-H-2), 2.94 (dd,
 5 1H, $J=4.5\text{ Hz}$, 17.2 Hz, Asn- βCH), 2.85 (dd, 1H,
 $J=7.0\text{ Hz}$, 17.2 Hz, Asn- βCH), 2.67, 2.66 (dd, 2
 H, $J=4.6\text{ Hz}$, 12.4 Hz, NeuAc 7, 7-H-3_{eq}), 2.07
 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 6H, Ac $\times 2$), 2.02 (s, 6H, Ac
 $\times 2$), 2.01 (s, 3H, Ac), 1.71 (dd, 2H, $J=12.4\text{ Hz}$,
 10 12.4 Hz, NeuAc 7, 7-H-3_{ax}.)



参考例 2 化合物 1、2、3 および 4 の合成

- 参考例 1 で得られた $\alpha 2, 6$ -ジシアロ糖鎖アスパラギン (609 mg, 26
 1 μmol) を水 20.7 ml に溶解させ、さらに 0.1 規定塩酸 13.8 ml を
 15 加えた。この溶液を 70℃ で 35 分間加熱した後速やかに氷冷し、飽和炭酸水素
 ナトリウム水溶液を加え pH 7 とした。これを凍結乾燥した後、残留物をゲル濾
 過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25、2.5 $\phi \times 1\text{ m}$ 、
 展開溶媒は水、流速は 1.0 ml/min) で精製したところ、 $\alpha 2, 6$ -ジシア
 ロ糖鎖アスパラギン、2 種の $\alpha 2, 6$ -モノシアロ糖鎖アスパラギンおよびアシ

アロ糖鎖アスパラギンの混合物 534 mg を得た。この 4 成分はそれぞれを単離することなく次の工程に進めた。

なお、得られた糖鎖混合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30°C)

- 5 5.13 (s, Man4-H1), 5.12 (s, Man4-H1), 5.01 (d, GlcNAc1-H1), 4.94 (s, Man4'-H1), 4.93 (s, Man4'-H1), 4.82 (s, Man3-H1), 4.60 (d, GlcNAc2-H1), 4.58 (d, GlcNAc5,5'-H1), 4.47 (dd, Gal6, 6'-H1), 4.44 (d, Gal6, 6'-H1), 4.24 (d, Man3-H2), 4.19 (d, Man4'-H2), 4.11 (d, Man4-H2), 2.97 (bdd, AsN- β CH), 2.72 (dd, NeuAc7-H3eq, NeuAc7-H3eq), 2.64 (bdd, AsN- β CH), 2.15 (s \times 5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7-H3ax, NeuAc7'-H3ax)

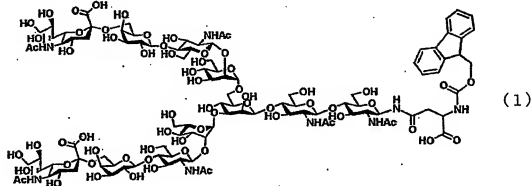
- 15 得られた糖鎖の混合物 429 mg をアセトン 16.3 ml と水 11.2 ml に溶解させた。ここに 9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネート (155.7 mg, 461.7 μmol) と炭酸水素ナトリウム (80.4 mg, 957 μmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。この溶液をエバポレーターに供してアセトンを除き、残りの溶液をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25, 2.5 $\phi \times$ 1 m, 展開溶媒は水、流速は 1.0 ml/min) で精製したところ、化合物 1、化合物 2 および 3、化合物 4 の混合物 309 mg が得られた。この混合物を HPLC (ODS カラム、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液: メタノール = 65:35, 2.0 $\phi \times$ 25 cm, 流速 3 ml/min) を用いて精製したところ、51 分後に化合物 1 が、67 分後に化合物 2 および 3 の混合物が、93 分後に化合物 4 が溶出した。それぞれを取り分け凍結乾燥を行った後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephade

x G-25、2.5φ×30 cm、展開溶媒は水、流速は1.0 ml/min) で脱塩することで目的の化合物2および3の混合物150 mgを得た。

なお、得られた化合物1の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30°C)

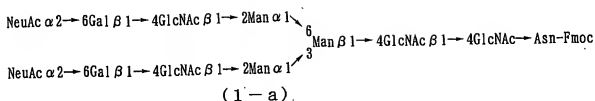
- 7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4
H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d,
GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1
H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.6
7 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6,
6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Ma
n4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, bdd,
Asn-βCH), 3.00 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.76 (2H,
dd, NeuAc7,7'-H3eq), 2.15 (18H, s×6, -Ac),
1.79 (2H, dd, NeuAc7,7'-H3ax); HRMS Calcd
for $\text{C}_{103}\text{H}_{154}\text{N}_8\text{NaO}_{66}$ [M+Na+] 2581.8838, foun
d, 2581.8821



上記の糖鎖の構造を記号化すると次のようになる。ここで

- NeuAc: シアル酸 Gal: D-ガラクトース GlcNAc: N-ア
セチルグルコサミン Man: D-マンノース Asn: アスパラギン

を示す。



また、得られた化合物 2 および 3 の混合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30°C)

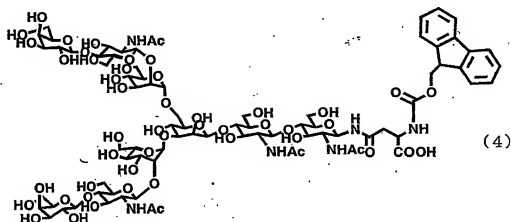
- 5 7.99 (d, Fmoc), 7.79 (d, Fmoc), 7.55 (m, Fmoc),
 5.14 (s, Man4-H1), 5.12 (s, Man4-H), 5.00 (d,
 GlcNAc1-H1), 4.94 (s, Man4'-H1), 4.93 (s, Ma
 n4'-H1), 4.82 (s, Man3-H1), 4.60 (d, GlcNAc2
 -H1), 4.58 (d, GlcNAc5,5'-H1), 4.46 (dd, Gal
 10 6,6'-H1), 4.44 (d, Gal6,6'-H1), 4.24 (d, Man3
 -H2), 4.19 (d, Man4'-H2), 4.11 (d, Man4-H2),
 2.97 (bdd, AsN- β CH), 2.72 (dd, NeuAc7-H3eq,
 NeuAc7-H3eq), 2.64 (bdd, AsN- β CH), 2.15 (s \times
 5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7-H3ax, NeuAc7'-H3
 15 ax)

また、得られた化合物 4 の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30°C)

- 7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4
 H, m, Fmoc), 5.12 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d,
 20 GlcNAc1-H1), 4.93 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1
 H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.6
 7 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6,
 6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Ma
 n4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, bdd,

AsN- β CH), 3.00 (1H, bdd, AsN- β CH), 2.15 (12H, s \times 4, -Ac); HRMS Calcd for $C_{81}H_{120}N_6NaO_{50}$ [M+Na+] 1999.6930, found, 1999.6939



- 5 上記の化合物4の構造の簡略化したものを表2に示す。

参考例3 化合物2、3の合成および単離

- 参考例2で得られた化合物2、3の混合物 (5.0 mg, 2.2 μ mol) を 20 μ Lの水に溶解させ、22 mMの炭酸セシウム水溶液を100 μ L加え、pH 7.0とした。この溶液を凍結乾燥した。乾燥後の固形物にN,N-ジメチルホルムアミドを430 μ L加え、更に6.6 μ molのベンジルプロマイド/N,N-ジメチルホルムアミド溶液を20 μ L加えた。この溶液をアルゴン雰囲気下で攪拌した。48時間後、TLC (展開溶媒は1M NH_4OAc :イソプロパノール=1:2を用いた) にて原料の消失を確認した後、4.4 mLのジエチルエーテルを加えて化合物を沈殿させた。沈殿した糖鎖を濾過し、残った糖鎖を水に溶解させ凍結乾燥した。凍結乾燥後の残留物を分取HPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.20 20178、20 \times 250 mm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=78:22、流速4.0 mL/min) で精製したところ、8分後に化合物3が、9分後に化合物2が溶出した。それぞれを取り分け、更

にODSカラム（コスモシル75C18-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた）で脱塩したところ、目的とする化合物2のベンジル体が1.6mg、化合物3のベンジル体が1.8mg得られた。

- 5 化合物2のベンジル体（10糖、13.6mg、5.8mmol）を、氷冷下にNaOH aq.（pH=12）1.4mlに溶解させた。反応をHPLCでモニターしながら約8時間攪拌した。反応の進行が終了した時点で、反応液を40mM HClにてpH=7.0に調整した。中和後の液を、メンブランフィルターで濾過した後、濃縮、次いでHPLC（YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM, 20×250mm, AN/25mM AcONH₄ buffer=20/80, 7.0ml/min., wave length; 274nm）にて分取・精製を行った。分取した液を濃縮後、ODSカラム（コスモシル75C₁₈-OPN, ナカライテスク社製）にて脱塩処理を行い、濃縮、凍結乾燥を行うと、目的とする化合物2（6.2mg, 47.4%）が得られた。
- 15 得られた化合物の物理的データは以下の通りである。化合物2の構造の簡略化したものを表1に示す。

¹H NMR（400MHz, D₂O, 30℃, HOD=4.81）

- δ 8.00（d, 2H, J=7.2, Fmoc）, 7.79（d, 2H, J=7.2, Fmoc）, 7.59（dd, 2H, J=7.2, Fmoc）, 7.53（d, 2H, J=7.2, Fmoc）, 5.22（s, 1H, Man4-H1）, 5.09（d, 1H, J=9.8, GlcNAc1-H1）, 5.01（s, 1H, Man4'-H-1）, 4.85（s, 1H）, 4.58-4.75（m, 5H）, 4.57（dd, 2H, J=8.0）, 4.38-4.48（m, 2H）, 4.33（s, 1H）, 4.28（bs, 1H, Man4-H2）, 4.19（bs, 1H）, 2.64-2.85（m, 3H, Asn-βCHx2, NeuAc7-H3eq）, 2.16, 2.13, 2.12（each s, 12H, Acx4）, 1.98（s,
- 20
- 25

3H, Ac) 1.80 (dd, 1H, $J_a=12.0$, $J_b=12.0$, NeuAc7-H3ax).

- 化合物3のベンジル体(10糖、5.0mg、2.1mmol)を、氷冷下にNaOHaq. (pH=12) 2.0mlに溶解させた。反応をHPLCでモニターしながら約5時間攪拌した。反応の進行が終了した時点で、反応液を40mM HClにてpH=7.0に調整した。中和後の液を、メンブランフィルターで濾過した後、濃縮、次いでHPLC (YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM, 20×250mm, AN/25mM AcONH₄ buffer=20/80, 7.0ml/min., wavelength; 274nm) にて分取・精製を行った。分取した液を濃縮後、ODSカラム(コスモシール 75C₁₈-OPN, ナカライテスク社製)にて脱塩処理を行い、濃縮、凍結乾燥を行うと、目的とする化合物3(2.5mg, 52.0%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。化合物3の構造の簡略化したものを表1に示す。
- ¹H NMR (400MHz, D₂O, 30℃, HOD=4.81)
- δ 8.01 (d, 2H, $J=7.6$, Fmoc), 7.80 (d, 2H, $J=7.6$, Fmoc), 7.59 (dd, 2H, $J=7.6$, Fmoc), 7.52 (dd, 2H, $J=7.6$, Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man4-H1), 5.09 (d, 1H, $J=9.5$, GlcNAc1-H1), 5.03 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.58-4.71 (m, 5H), 4.54 (t, 2H, $J=7.5$), 4.40-4.50 (b, 2H), 4.34 (s; 1H), 4.28 (bs, 1H, Man4-H2), 4.19 (bs, 1H), 2.70-2.85 (m, 2H, Asn-βCH, NeuAc7-H3eq), 2.55-2.70 (m, 1H, Asn-βCH), 2.16, 2.15, 2.13, 2.11 (eachs, 12H, Acx4), 1.98 (s, 3H, Ac) 1.80 (dd, 1H, $J_a=12.4$, $J_b=12.4$, NeuAc7-H3ax).

参考例 4 化合物 5 および 6 の合成

- 参考例 2 で得られた化合物 2 および 3 の混合物 (224 mg, 97 μ mol) とウシ血清アルブミン 24 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 6.0) 22 ml に溶解させ、さらに *Diplococcus pneumoniae* 由来 β -ガラクトシダーゼ (1.35 U) を加えた。この溶液を 37℃ で 15 時間静置した後、凍結乾燥を行った。残留物を HPLC (ODS カラム, 2.0 ϕ \times 25 cm, 展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル = 85:15、流速 3 ml/min) で精製したところ、129 分後に化合物 5 が、134 分後に化合物 6 が溶出した。それぞれを取り分け、凍結乾燥を行った。続いて HPLC [ODS カラム, 2.0 ϕ \times 25 cm, 展開溶媒は最初の 15 分間が水、16 分後から 30 分後までは水: アセトニトリル (容量比) = 10:0 から 85:15、31 分後から 45 分後までは水: アセトニトリル = 85:15 から 80:20 になるようにグラジエントを掛けた。流速は 3.0 ml/min] を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 5 が 81 mg、化合物 6 が 75 mg 得られた。

なお、得られた化合物 5 の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30℃)

- 7.99 (2H, d, Fmoc); 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (1H, d, Gal6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 2.97 (1H, bdd, AsN- β CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H3eq), 2.61 (1H, bdd, AsN- β CH), 2.15 (15H, s \times 5, -Ac), 1.7

9 (1H, dd, NeuAc 7' -H3ax); HRMS Calcd for $C_{86}H_{127}N_7NaO_{53}$ [M+Na+] 2128.7356, found, 2128.7363

また、得られた化合物6の物理的データは以下の通りである。

5 1H -NMR (D_2O , 30°C)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4
H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d,
GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4' -H1), 4.82 (1
H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.6
10 7 (2H, d, GlcNAc5,5' -H1), 4.53 (1H, d, Gal6-
H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'
-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 2.97 (1H, bdd, As
N- β CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H3eq), 2.60 (1H,
bdd, AsN- β CH), 2.15 (15H, s \times 5, -Ac), 1.79 (1H,
15 dd, NeuAc7-H3ax); HRMS Calcd for $C_{86}H_{125}$
 $N_7Na_3O_{53}$ [M+Na+] 2172.6995, found, 2172.70
84

参考例5 化合物7および8の合成

参考例4で得られた化合物5および6の混合物 (90mg, 47.3 μ mo
20 l) をそれぞれ分離することなく、ウシ血清アルブミン8mgと共にHEPES
緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 8.1mlに溶解させ、さらにBovine
kidney由来 β -グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from
Bovine kidney) を2.88U加えた。この溶液を37°Cで18時
間静置した後凍結乾燥し、残留物をHPLC (ODSカラム、2.0 ϕ \times 25c
25 m、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：メタノール=65：35、流
速3ml/min) で精製したところ、117分後に化合物7が、127分後に

化合物 8 が溶出した。それぞれを取り分け、凍結乾燥を行った。続いて HPLC (ODS カラム、2.0 ϕ \times 25 cm、展開溶媒は最初の 15 分間が水、16 分後から 30 分後までは水 : アセトニトリル = 10 : 0 から 85 : 15、31 分後から 45 分後までは水 : アセトニトリル = 85 : 15 から 80 : 20 になるよう
5 にグラジエントを掛けた。流速は 3.0 ml/min) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 7 が 40 mg、化合物 8 が 37 mg 得られた。

なお、得られた化合物 7 の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30 $^\circ\text{C}$)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4
10 H, m, Fmoc), 5.22 (1H, s, Man4-H1), 5.08 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.94 (1H, s, Man4'-H1), 4.84 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (1H, d, GlcNAc5-H1), 4.55 (1H, d, Gal6-H1), 4.33 (1H, dd, Man3-H2), 4.20 (1H, dd, Man4-H
15 2), 4.15 (1H, dd, Man4'-H2), 2.97 (1H, bdd, AsN- β CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H3eq), 2.62 (1H, bdd, AsN- β CH), 2.15 (12H, s \times 4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H3ax); HRMS Calcd for $\text{C}_{78}\text{H}_{114}\text{N}_6\text{NaO}_{48}$ [M+Na+] 1925.6562, found,
20 1925.6539

また、得られた化合物 8 の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30 $^\circ\text{C}$)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4
H, m, Fmoc), 5.15 (1H, S, Man4-H1), 5.06 (1H, d,
25 GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.6

7 (2H, d, GlcNAc 5, 5' -H1), 4.53 (2H, d, Gal 6, 6' -H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4' -H2), 2.97 (1H, bdd, AsN- β CH2), 2.76 (1H, dd, NeuAc 7' -H3eq), 2.61 (1H, bdd, AsN- β CH2), 2.15 (12H, s \times 4, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc 7' -H3ax); HRMS Calcd for $C_{78}H_{114}N_6NaO_{48}$ [M+Na+] 1925.6562, found, 1925.6533

参考例 6 化合物 9 の合成

参考例 5 で得られた化合物 7 (30mg, 473 μ mol) とウシ血清アルブミン 3mg を HEPES 緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 6ml に溶解させ、さらに Jack Beans 由来 α -マンノシダーゼを 10U 加えた。この溶液を 37℃ で 21 時間静置した後凍結乾燥し、続いて HPLC (ODS カラム、2.0 ϕ \times 25cm、展開溶媒は最初の 15 分間が水、16 分後から 30 分後までは水 : アセトニトリル = 10 : 0 から 85 : 15、31 分後から 45 分後までは水 : アセトニトリル = 85 : 15 から 80 : 20 になるようにグラジエントを掛けた。流速は 3.0ml/min) を用いて精製したところ、目的とする化合物 9 が 20mg 得られた。

なお、得られた化合物 9 の物理的データは以下の通りである。

1 H-NMR (D_2O , 30℃)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.00 (1H, d, GlcNAc 1-H1), 4.95 (1H, s, Man4' -H1), 4.84 (1H, s, Man3-H1), 4.67 (1H, d, GlcNAc 2-H1), 4.56 (1H, d, GlcNAc 5-H1), 4.44 (1H, d, Gal 6-H1), 4.11 (1H, dd, Man4' -H2), 4.07 (1H, dd, Man3-H2), 2.97 (1H, bdd, AsN- β CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc 7' -H3eq), 2.62

(1H, bdd, AsN- β CH), 2.15 (12H, s \times 4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7'-H3ax); HRMS Calcd for $C_{72}H_{104}N_6NaO_{43}$ [M+Na+] 1763.6034, found, 1763.6074

5 参考例7 化合物10の合成

参考例5で得られた化合物8 (40mg, 630 μ mol) とウシ血清アルブミン5gをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 7.8mlに溶解させ、Jack Beans由来 α -マンノシダーゼを38U加えた。この溶液を37℃で63時間静置した後凍結乾燥し、続いてHPLC (ODSカラム、2.0 ϕ \times 25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水:アセトニトリル=10:0から85:15、31分後から45分後までは85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min) を用いて精製したところ、目的とする化合物10が30mg得られた。

なお、得られた化合物10の物理的データは以下の通りである。

15 1 H-NMR (D_2O , 30℃)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.23 (1H, s, Man4-H1), 5.08 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.53 (1H, d, Gal6-H1), 4.32 (1H, dd, Man3-H2), 4.28 (1H, dd, Man4-H2), 2.81 (1H, bdd, AsN- β CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H3eq), 2.59 (1H, bdd, AsN- β CH), 2.13 (12H, s \times 4, -Ac), 1.80 (1H, dd, NeuAc7H3ax); HRMS Calcd for $C_{72}H_{104}N_6NaO_{43}$ [M+Na+] 1763.6034, found, 1763.6041

25 参考例8 化合物11の合成

化合物5 (28mg, 21.3 μ mol) とウシ血清アルブミン1.0mgをH

EPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 454 μ L)に溶解させ、ノイラミ
ニダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from Vibrio Cholera
e, 198mU)を加えた。この溶液を37℃で20時間静置した後、HPLC
分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed
5 Column D-ODS-5S-5 120A ODS No.202017
8、20 \times 250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニ
トリル=80：20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コ
スモシール75C18-OPN、15 \times 100mm、最初にH₂Oを50mL流
し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的と
10 する化合物11(17mg, 収率70%)が得られた。得られた化合物の物理的
データは以下の通りである。

化合物11の構造の簡略化したものを表2に示す。

¹H-NMR(30℃)

δ 7.91(d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71(d, 2H, J=
15 7.5Hz, Fmoc), 7.51(dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc),
7.43(dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.12(s, 1H, Man
4-H-1), 4.99(d, 1H, J=9.5Hz, GlcNAc1-H-1),
4.92(s, 1H, Man4'-H-1), 4.76(s, 1H, Man3-H
-1), 4.58(d, 1H, J=8.0Hz, GlcNAc2-H-1), 4.5
20 5(d, 1H, J=8.4Hz, GlcNAc5'-H-1), 4.47(d, 1
H, J=7.8Hz, Gal6'-H-1), 4.34(t, 1H, Fmoc),
4.24(bd, 1H, J=1.9Hz, Man3-H-2), 4.18(bdd,
1H, J=1.4Hz, 3.3Hz, Man4-H-2), 4.11(bdd, 1H,
J=1.4Hz, 3.5Hz, Man4'-H-2), 2.72(bdd, 1H, J
25 =3.0Hz, 15.7Hz, AsN- β CH), 2.52(bdd, 1H, J=
8.7Hz, 15.7Hz, AsN- β CH), 2.06, 2.05, 2.04,

1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for $C_{75}H_{110}N_6NaO_{45}$ $[M+Na+]$ 1837.6402, found 1837.6471

参考例 9 化合物 12 の合成

- 5 化合物 6 (20mg, $9.4 \mu\text{mol}$) とウシ血清アルブミン 1.6mg を HEPES 緩衝溶液 (50mM, pH 5.0, $323 \mu\text{L}$) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 141mU) を加えた。この溶液を 37℃ で 18 時間静置した後、HPLC 分析により反応終了を確認した。続いて HPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, $20 \times 250\text{mm}$ 、展開溶媒は 50mM 酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル = 80:20、流速 4mL/min) で精製した。更に ODS カラム (コスモシル 75C18-OPN, $15 \times 100\text{mm}$ 、最初に H_2O を 50mL 流し、次に 25% アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物 12 (13mg, 収率 76%) を得た。得られた化合物の構造は $^1\text{H-NMR}$ が標品と一致したことから確認した。

化合物 12 の構造の簡略化したものを表 2 に示す。

参考例 10 化合物 13 の合成

- 20 化合物 7 (45mg, $24 \mu\text{mol}$) とウシ血清アルブミン 1.7mg を HEPES 緩衝溶液 (50mM, pH 5.0, $820 \mu\text{L}$) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 134mU) を加えた。この溶液を 37℃ で 14 時間静置した後、HPLC 分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液を HPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, $20 \times 250\text{mm}$ 、展開溶媒は 50mM 酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル = 80:20、流速 4mL/min) で精製した。更に OD

Sカラム（コスモシル75C18-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた）で脱塩したところ、目的とする化合物13（28mg、収率74%）が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

- 5 化合物13の構造の簡略化したものを表2に示す。

¹H-NMR (30℃)

- 10 δ 7.92 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.44 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 2H, GlcNAc2,5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=8.0Hz, Gal6'-H-1), 4.35 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bd, 1H, J=1.9Hz, Man3-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5Hz, AsN-βCH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.7Hz, 15.5Hz, AsN-βCH), 2.06, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for C₆₇H₉₇N₅NaO₄₀ [M+Na+ 1634.5608, found, 1634.5564]
- 20 5564

参考例11 化合物14の合成

- 化合物8（47mg、25μmol）とウシ血清アルブミン1.9mgをHE PES緩衝溶液（50mM, pH5.0, 840μL）に溶解させ、ノイラミダザゼ（シグマアルドリッチ社製、from Vibrio Cholerae, 369mU）を加えた。この溶液を37℃で37時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液を凍結乾燥し、続いてHPLC（YMC
- 25

Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS N
o. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム
水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4mL/minで精製した。更に
ODSカラム（コスモシル75C18-OPN、15×100mm、最初にH
2Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた）で脱塩し
たところ、目的とする化合物14（26mg、収率65%）を得た。得られた化
合物の物理的データは以下の通りである。

化合物14の構造の簡略化したものを表2に示す。

¹H-NMR (30℃)

- 10 δ 7.92 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.4Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.57 (bd, 2H, GlcNAc 2,5'-H-1), 4.46 (d, 1H, J=7.5Hz, Gal 6'-H-1), 4.34 (t, 3H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man 4'-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man 4-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5Hz, AsN-βCH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.2Hz, 15.5Hz, AsN-βCH),
20 2.06, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for C₆₇H₉₇N₅NaO₄₀ [M+Na+] 1634.5608, found, 1634.5644

参考例12 化合物15の合成

- 化合物9（32mg、18.4μmol）とウシ血清アルブミン2.5mgをH
25 EPES緩衝溶液（50mM、pH5.0、713μL）に溶解させ、ノイラミ
ニダーゼ（シグマアルドリッチ社製、from Vibrio Cholera

e, 134mU)を加えた。この溶液を37℃で17時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2 020178, 20×250mm, 展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN, 15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物15 (13mg, 収率52%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

- 10 化合物15の構造の簡略化したものを表2に示す。

¹H-NMR (30℃)

- δ 7.92 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.44 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.00 (d, 1H, J=9.9Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 2H, J=7.5Hz, GlcNAc2,5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=7.8Hz, Gal6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.10 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4'-H-2), 2.72 (b
15 dd, 1H, J=15.5Hz, AsN-βCH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.2Hz, 15.5Hz, AsN-βCH), 2.07, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for C₆₁H₈₈N₅O₃₅ [M+H⁺] 1450.5, found, 1450.3

参考例13 化合物16の合成

- 25 化合物10 (28mg, 16μmol)とウシ血清アルブミン1.7mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 624μL)に溶解させ、ノイラミ

ニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Vibrio Cholerae, 117 mU) を加えた。この溶液を 37℃ で 17 時間静置した後、HPLC 分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液を HPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2 5 020178、20×250mm、展開溶媒は 50mM 酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速 4mL/min) で精製した。更に OD S カラム (コスモシル 75C18-OPN、15×100mm。最初に H₂O を 50mL 流し、次に 25% アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物 16 (14.6mg, 収率 68%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

化合物 16 の構造の簡略化したものを表 2 に示す。

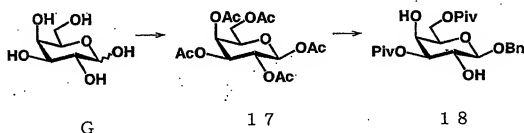
¹H-NMR (30℃)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc),
 15 7.43 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5Hz, GlcNAc1-H-1),
 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (d, 2H, J=7.2Hz, GlcNAc2-H-1), 4.46 (d, 1H, J=7.8Hz, Gal6-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (bd, 1H, J=2.7Hz,
 20 Man3-H-2), 4.19 (b, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=15.5Hz, AsN-βCH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.8Hz, 15.5Hz, AsN-βCH), 2.05 (s, 6H, Ac×2), 1.89 (s, 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for C₆₁H₈₈N₅O₃,
 5 [M+H]⁺ 1450.5, found, 1450.3

25 参考例 14 (5-アセタミド-3,5,7-トリデオキシ-7-フルオロ-D-グリセロ-β-D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (7-フ

ルオロシアル酸)

5-Acetamide-3,5,7-trideoxy-7-fluoro-D-glycero- β -D-galacto-2-nonulopyranosidonic acid 25の合成)



5 (1) 化合物17の合成

無水酢酸 (60 ml) に酢酸ナトリウム (5 g, 69 mmol) を溶かし、加熱した後にD-ガラクトース (G) (10 g, 55 mmol) を少しずつ加える。2時間加熱還流した後TLC (トルエン：酢酸エチル=5：1) にて反応が終了したことを確認した。反応溶液を室温に戻した後に、氷水300 cc に注ぐ。ろ

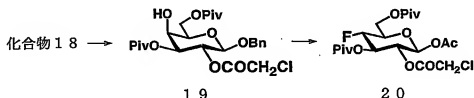
- 10 過して沈殿物を集める。沈殿物をエタノール (14 ml) の溶かし再結晶を行い、化合物17を9.0 g (収率41%) 得た。

(2) 化合物18の合成

化合物17 (4.3 g, 11 mmol) を塩化メチレン (120 ml) の溶かした後、アルゴン気流下-20℃まで冷却した。続いて、反応溶液に四塩化スズ (3.1 g, 12 mmol) を加え20分攪拌した後、ベンジルアルコール (2.3 g, 22 mmol) を加え反応温度を室温に戻した。TLC (ヘキサン：酢酸エチル=1：1) で反応終了を確認後、反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に注ぎ、塩化メチレンで抽出した。塩化メチレン層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮した。残渣をデシケーターで乾燥後、蒸留したメタノール (80 ml) に溶かしナトリウムメトキシド (431 mg, 5.5 mmol) を加えアルゴン気流下攪拌した。TLC (酢酸エチル：メタノール：水=10：

- 20 (80 ml) に溶かしナトリウムメトキシド (431 mg, 5.5 mmol) を加えアルゴン気流下攪拌した。TLC (酢酸エチル：メタノール：水=10：

- 5 : 1) で反応終了を確認した後、陽イオン交換樹脂 I R - 1 2 0 (+) で中和し反応を終了させた。樹脂をろ過して取り除いた後、濾液を減圧濃縮した。残渣をデシケータで乾燥後、ピリジン (4 4 m l) に溶かし、反応溶液を 0℃ に冷却した。反応溶液にトリメチルアセチルクロリド (4. 6 g, 3 8. 5 m m o l) を
- 5 加えた後、室温に戻しアルゴン気流下 1 時間攪拌した。反応終了を T L C (ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) で確認し 0℃ に冷却後メタノールを加え反応を終了させた。反応溶液をそのまま減圧濃縮した後、残渣を酢酸エチルに溶かし飽和食塩水溶液、水で洗浄し無水硫酸マグネシウムで酢酸エチルを乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ過して取り除いた後、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) で精製し化合物 1 8 (2. 8 g, 収率 5 8 %) を得た。



(3) 化合物 1 9 の合成

- 化合物 1 8 (2 0 0 m g, 0. 4 5 5 m m o l) をジクロロメタン (7. 8 m l) とピリジン (1. 3 m l) に溶かし、無水クロロ酢酸 (1 5 5 m g, 0. 9 1 m m o l) を加えて、アルゴン気流下 - 1 5℃ で攪拌しながら 1 5 分間反応させた。反応終了を確認後、メタノール (5 m l) で無水クロロ酢酸をクエンチし、トルエンで 3 回共沸しながら減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。
- 20 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 4) で精製し、化合物 1 9 (収量 1 7 2 m g, 収率 7 3. 5 %) を得た。

¹H-NMR (4 0 0 M H z, C D C l₃)

δ 7. 3 7 - 7. 2 9 (m, 5 H, P h), 5. 3 9 (d d, 1 H, J_{1, 2} =

- 8.0 Hz, $J_{2,3}=10.4$ Hz, H-2), 4.89 (dd, 1H, $J_{3,4}=3.4$ Hz, H-3), 4.89, 4.62 (2d, 2H, $J=12.5$ Hz, OC H₂Ph), 4.53 (d, 1H, H-1), 4.37 (dd, 1H, $J_{6a,6b}=11.5$ Hz, $J_{6a,5}=6.0$ Hz, H-6a), 4.32 (dd, 1H, $J_{6b,5}=6.6$ Hz, H-6b), 4.00 (m, 1H, H-4), 3.92 (s, 2H, COCH₂C1), 3.75 (dd, 1H, H-5), 1.23, 1.19 [2s, 18H, COC (CH₃)₃]
- ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃)
- δ 178.33, 177.57, 165.92, (C=O), 136.66, 128.48, 128.07, 127.89 (Ph), 99.16 (C-1), 72.82 (C-3), 72.35 (C-5), 70.92 (C-2), 70.49 (OCH₂Ph), 67.29 (C-4), 62.30 (C-6), 40.40 (CO CH₂C1), 38.95, 38.80 [COC (CH₃)₃], 27.14, 26.98 [COC (CH₃)₃]
- 15 ¹H-NMR、¹³C-NMRはBrukerのAVANCE 400 (400 MHzと表記)で測定した。溶媒が重クロロホルムの場合は内部標準としてトリメチルシランを用いた。その他の重溶媒を用いたときは溶媒ピークを基準とした。化学シフトは、δ (ppm)で、結合定数はJ (Hz)示した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、Merck Silicagel 60, 70-230 mesh又は230-400 meshを、球状シリカゲルは関東化学社製のSilica Gel 60 (Spherical)を、反応検出用 (以下TLC)としてはE. Merck社製DC-Platten Kieselgel 60 F254 (Art1, 05715)を使用した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC)のカラムはナカライテスク社製 COSMOSIL 5C₁₈-A
- 25 R Packed Column (φ4.6×150mm), を使用し、分光蛍光光度計は、JASCO社製のFP-210 Spectrofluoromet

erを用いた。

(4) 化合物20の合成

化合物19 (300mg, 0.583mmol) をジクロロメタン (5.8ml) に溶かし、アルゴン気流下-15℃で攪拌しながらジエチルアミノスルファートリフルオリド (DAST) を加えた。DASTを加え10分後室温に戻し1時間反応させた。TLCで原料消失を確認し、メタノール (3ml) でDASTをクエンチ後減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=1:6) で精製し化合物20 (収量211mg、収率70%)を得た。

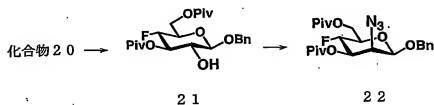
10 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3)

δ 7.37-7.27 (m, 5H, Ph), 5.31 (ddd, 1H, $J_{3,F}=14.3\text{Hz}$, $J_{3,4}=9.69\text{Hz}$, $J_{2,3}=9.63\text{Hz}$, H-3), 5.04 (dd, 1H, $J_{1,2}=7.93\text{Hz}$, H-2), 4.86 (d, 1H, $J=12.2\text{Hz}$, OCH_2Ph), 4.60 (d, 1H, H-1), 4.59 (d, 15 H, OCH_2Ph), 4.44 (ddd, 1H, $J_{4,5}=9.04\text{Hz}$, $J_{4,F}=50.6\text{Hz}$, H-4), 4.43 (ddd, 1H, $J_{6a,6b}=12.1\text{Hz}$, $J_{6a,5}=2.41\text{Hz}$, $J_{6a,F}=2.23\text{Hz}$, H-6a), 4.24 (ddd, 1H, $J_{6b,5}=5.67\text{Hz}$, $J_{6b,F}=1.28\text{Hz}$, H-6b), 3.93 (s, 2H, OCOCH_2Cl), 3.75 (m, 1H, H-5), 1.25, 1.18
20 [2s, 18H, $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$]

$^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz, CDCl_3)

δ 177.94, 117.43, 165.88 (C=O), 136.34, 128.55, 138.23, 127.92 (Ph), 98.68 (C-1), 87.35 (d, $J_{4,F}=188.62\text{Hz}$, C-4), 72.65 (d, $J_{2,F}=7.96\text{Hz}$, C-2), 72.05 (d, $J_{3,F}=20.02\text{Hz}$, C-3),
25 71.49 (d, $J_{5,F}=23.09\text{Hz}$, C-5), 70.80 (OCH_2Ph),

62.12 (C-6), 40.30 (OCOCH₂C1), 38.87 [OCOC
(CH₃)₃], 27.17, 26.92 [OCOC (CH₃)₃]



(5) 化合物 21 の合成

5 化合物 20 (625mg, 1.21mmol) をメタノール (24.2ml) に溶かし、アルゴン気流下 -15℃ で攪拌しながら、ナトリウムメトキシド (13.1mg, 0.6mmol) を加えた。30 分後 TLC で原料消失を確認後陽イオン交換樹脂 IR-120 (+) で中和 (pH 6-7) し、樹脂を濾過後減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=

10 1:4) で精製し化合物 21 (収量 395mg, 収率 74%) を得た。

 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 7.38-7.29 (m, 5H, Ph), 5.18 (ddd, 1H, $J_{3,F}=14.8\text{ Hz}$, $J_{3,4}=9.51\text{ Hz}$, $J_{2,3}=8.99\text{ Hz}$, H-3), 4.90 (d, 1H, $J=11.7$, OCH_2Ph), 4.63 (d, 1H, OCH_2Ph), 4.47 (ddd, 1H, $J_{5,6a}=2.43\text{ Hz}$, $J_{6a,F}=2.2\text{ Hz}$, H-6a), 4.47 (d, 1H, $J_{1,2}=7.7\text{ Hz}$, H-1), 4.38 (ddd, 1H, $J_{4,5}=8.96\text{ Hz}$, $J_{3,4}=9.67\text{ Hz}$, $J_{4,F}=50.8\text{ Hz}$, H-4), 4.23 (ddd, 1H, $J_{6a,6b}=12.0\text{ Hz}$, $J_{6b,5}=6.05\text{ Hz}$, $J_{6b,F}=1.26\text{ Hz}$, H-6b), 3.75 (m, 1H, H-5), 3.54 (m, 1H, $J_{2,\text{OH}}=2.70\text{ Hz}$, H-2), 1.27, 1.26 (2s, 18H, $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$)

 ^{13}C -NMR. (400 MHz, CDCl_3) δ 178.17, 177.94 (C=O), 136.54, 128.54,

128.17, 128.12 (Ph), 101.31 (C-1), 87.45 (d, $J_{4,F}=187.39\text{ Hz}$, C-4), 74.17 (d, $J_{3,F}=18.88\text{ Hz}$, C-3), 72.45 (d, $J_{2,F}=7.56\text{ Hz}$, C-2), 71.45 (d, $J_{5,F}=23.26\text{ Hz}$, C-5), 71.09 (OCH_2Ph), 62.44 (C-6), 38.90, 38.85 [$\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$], 27.14, 26.99 [$\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$]

(6) 化合物 22 の合成

ピリジン (22.2 μl , 0.274 mmol) を溶かしたジクロロメタン (370 μl) 溶液に 0℃ で無水トリフルオロメタンスルホン酸 (46 μl , 0.274 mmol) を滴下し、15 分後、化合物 21 をジクロロメタン (1 ml) に溶かしたものを 0℃ で滴下した。TLC で原料消失を確認し、反応混合物をジクロロメタンで希釈した。有機層を飽和重曹水、飽和食塩水、水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後濃縮した。残渣を真空ポンプでさらに乾燥後ベンゼン (1 ml) に溶かし、アルゴン気流下室温でアジ化ナトリウム (13 mg, 0.206 mmol)、テトラアンモニウムクロライド (57 mg, 0.206 mmol) を加え 40℃ で反応させた。2 時間後 TLC で原料消失を確認後減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水、水で洗浄し無水硫酸マグネシウムで乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=1:4) で精製して化合物 22 (収量 30.4 mg, 収率 95%) を得た。

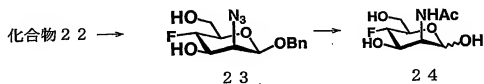
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 7.39–7.32 (m, 5H, Ph), 4.99 (ddd, 1H, $J_{3,F}=13.18\text{ Hz}$, $J_{3,4}=9.27\text{ Hz}$, $J_{2,3}=3.87\text{ Hz}$, H-3), 4.93 (d, 1H, $J=12.07\text{ Hz}$, OCH_2Ph), 4.67 (d, 1H, $J_{1,2}=1.18\text{ Hz}$, H-1), 4.63 (d, 1H, OCH_2Ph), 4.51 (ddd, 1H, $J_{6a,6b}=11.95\text{ Hz}$, $J_{6a,5}=2.54\text{ Hz}$, $J_{6a,F}=$

2.08 Hz, H-6 a), 4.23 (ddd, 1H, $J_{6b,5}=6.14$ Hz, $J_{6b,F}=1.14$ Hz, H-6 b), 4.08 (m, 1H, H-2), 3.64 (m, 1H, H-5), 1.26 [2s, 18H, OCOC ($\underline{\text{CH}_3}$)₃]

^{13}C -NMR (400MHz, CDCl_3)

- 5 δ 178.01, 177.68 (C=O), 136.06, 128.63, 128.31, 128.14 (Ph), 97.25 (C-1), 85.51 (d, $J_{4,F}=183.97$, C-4), 72.01 (d, $J_{5,F}=23.89$, C-5), 71.73 (d, $J_{3,F}=18.98$, C-3)
- 7 0.57 (OCH_2Ph), 62.42 (C-2, C-6), 39.08, 38.9
- 10 0 [OCOC ($\underline{\text{CH}_3}$)₃], 27.18, 26.95 [OCOC ($\underline{\text{CH}_3}$)₃]



(7) 化合物 23 の合成

- 化合物 22 (180mg, 0.387mmol) をメタノール (8ml) に溶かしナトリウムメトキシド (922mg, 9.67mmol) を加え攪拌し 4
- 15 0℃で反応させた。4.5時間後 TLC で1スポットにまとまったことを確認し陽イオン交換樹脂 IR-120 (+) で中和後、濾過し濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=1:1) で精製し化合物 23 (収量105.3mg, 収率91.6%) を得た。

^1H -NMR (400MHz, CDCl_3),

- 20 δ 7.40-7.31 (m, 5H, Ph), 4.96 (d, 1H, $J=12.13$ Hz, OCH_2Ph), 4.71 (d, 1H, $J_{1,2}=1.33$ Hz, H-1), 4.69 (d, 1H, OCH_2Ph), 4.49 (ddd, 1H, $J_{4,F}=51.0$ 6 Hz, $J_{4,5}=9.19$ Hz, $J_{3,4}=9.20$ Hz, H-4), 4.02 (m,

1H, H-2), 3.93 (dddd, 1H, $J_{6a, 6b}=12.19\text{ Hz}$, $J_{6a, 5}=2.31\text{ Hz}$, $J_{6a, F}=2.32\text{ Hz}$, $J_{6a, OH}=6.20\text{ Hz}$, H-6a), 3.89-3.77 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.39 (m, 1H, H-5),

5 ^{13}C -NMR (400MHz, CDCl_3),

δ 136.39, 128.62, 128.24, 127.83 (Ph), 98.63 (C-1), 88.19 (d, $J_{4, F}=178.91\text{ Hz}$, C-4), 73.95 (d, $J_{5, F}=25.48\text{ Hz}$, C-5), 71.18 (OCH_2Ph), 71.16 (d, $J_{3, F}=19.69\text{ Hz}$, C-3), 64.48 (d, $J_{2, F}=8.42\text{ Hz}$,

10 C-2), 61.39 (C-6)

(8) 化合物24の合成

化合物23 (105mg, 0.353mmol) をメタノール (7ml) に溶かし無水酢酸 (333 μl , 3.53mmol) を加えた後、アルゴン気流下で触媒量の10% Pd/Cを加え水素置換してから室温で攪拌した。2時間後TL

15 Cで原料消失を確認し、活性炭濾過後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:メタノール=5:1) で精製し化合物24 (収量57mg, 収率72%) を得た。

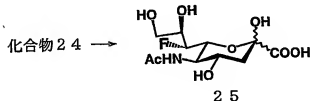
^1H -NMR (400MHz, D_2O),

20 δ 5.23 (dd, 1H, $J_{1, 2}=2.69\text{ Hz}$, $J_{1, F}=1.44\text{ Hz}$, H-1- α), 4.65 (ddd, 1H, $J_{4, F}=50.94\text{ Hz}$, $J_{3, 4}=9.06\text{ Hz}$, $J_{4, 5}=9.58\text{ Hz}$, H-4- α), 4.47 (m, 1H, H-2- α), 4.43 (ddd, 1H, $J_{3, F}=14.28\text{ Hz}$, $J_{2, 3}=4.9\text{ Hz}$, H-3- α), 4.16 (m, 1H, H-5- α), 3.95 (m, 2H, H-6a- α , H-6b- α), 2.14 (s, 3H, NHCOCH_3 - α)

25 ^{13}C -NMR (400MHz, D_2O),

δ 175.27 (C=O- α), 93.46 (C-1- α), 88.30 (d, J

$4, F = 177.00 \text{ Hz}$, $C-4-\alpha$), 69.91 (d, $J_{5, F} = 24.41 \text{ Hz}$, $C-5-\alpha$), 67.60 (d, $J_{3, F} = 18.74 \text{ Hz}$, $C-3-\alpha$), 60.36 ($C-6$), 54.12 (d, $J_{2, F} = 8.68 \text{ Hz}$, $C-2-\alpha$), 22.31 ($\text{NHCOCH}_3-\alpha$)



5

(9) 化合物 25 の合成

- 化合物 24 (50 mg, 0.224 mmol) ピルビン酸ナトリウム (123 mg, 1.12 mmol) と牛血清アルブミン (5 mg) をリン酸ナトリウム緩衝溶液 (100 mM, pH 7.5, 3.4 ml) に溶かし、その後シアル酸アルドラーゼ (50 U) を加え室温で反応を開始した。24 時間後反応溶液を凍結乾燥させ、少量の水に溶かし陰イオン交換樹脂カラム (AG 1-X8, 200-400 mesh, formate form) にのせた。水 300 ml 流した後、1 M ギ酸で目的物を溶出させ減圧濃縮し、ゲル濾過カラム (Sephadex G-15, 水) で精製し化合物 25 (収量 40 mg, 収率 58.9%) を得た。
- 15 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O),
- δ 4.61 (dd, 1H, $J_{7,8} = 8.97 \text{ Hz}$, $J_{7, F} = 45.56 \text{ Hz}$, H-7), 4.18 (dd, 1H, $J_{5,6} = 10.63 \text{ Hz}$, $J_{6, F} = 29.86 \text{ Hz}$, H-6), 4.15 (m, 1H, H-4), 4.07 (m, 1H, H-8), 4.02 (dd, 1H, $J_{4,5} = 10.10 \text{ Hz}$, H-5), 3.90 (ddd, 1H, $J_{9a,9b} = 12.18 \text{ Hz}$, $J_{9a,8} = 2.77 \text{ Hz}$, $J_{9a, F} = 2.86 \text{ Hz}$, H-9a), 3.76 (ddd, 1H, $J_{9b,8} = 5.33 \text{ Hz}$, $J_{9b, F} = 2.06 \text{ Hz}$, H-9b), 2.40 (dd, 1H, $J_{3eq,3ax} = 13.00$, $J_{3eq,4} = 4.8 \text{ Hz}$, H-3eq), 2.15 (s, 3H, OCOCH_3), 2.00 (dd, 1
- 20

H, $J_{3ax,4} = 11.70 \text{ Hz}$, H-3 ax),

^{13}C -NMR (400 MHz, D_2O),

δ 175.17, 173.68 (C=O), 96.01 (C-1), 89.12 (d,

$J_{7,F} = 179.23 \text{ Hz}$, C-7), 69.67 (d, $J_{6,F} = 17.41 \text{ Hz}$,

5 C-6), 68.31 (d, $J_{8,F} = 26.50 \text{ Hz}$, C-8), 67.26 (C-4), 62.70 (C-6), 52.17 (C-5), 39.19 (C-3),

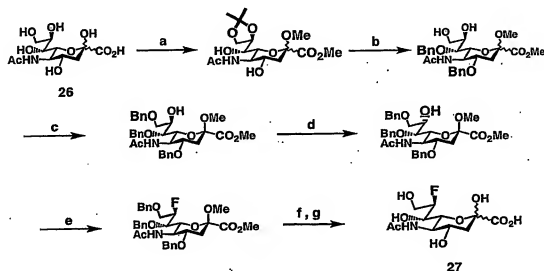
22.61 (NHCOCH_3),

参考例 15 (5-アセタミド-3, 5, 8-トリデオキシ-8-フルオロ-D-グリセロ- β -D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (8-フルオ

10 ロシアル酸)

5-Acetamide-3, 5, 8-trideoxy-8-fluoro-D-glycero- β -D-galacto-2-nonulopyranosidonic acid 27 の合成)

15 下記のスキームに従ってシアル酸 (26) から 5-アセタミド-3, 5, 8-トリデオキシ-8-フルオロ-D-グリセロ- β -D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (27) を合成した。



8-フルオロシアル酸のNMRデータを以下に示す。

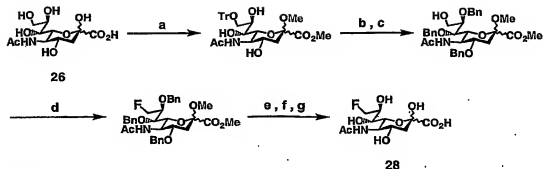
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O),

- δ 4.69 (dddd, 1H, $J_{8,\text{F}}=48.7\text{Hz}$, $J_{8,9\text{a}}=5.0\text{Hz}$, $J_{8,9\text{b}}=3.5\text{Hz}$, H-8), 4.03 (ddd, 1H, $J_{4,5}=10.0\text{Hz}$, $J_{3\text{ax},4}=11.1\text{Hz}$, $J_{3\text{eq},4}=4.7\text{Hz}$, H-4), 3.95 (dd, 1H, $J_{4,5}=10.0\text{Hz}$, $J_{5,6}=9.9\text{Hz}$, H-5), 3.94 (ddd, 1H, $J_{6,7}=\sim 0\text{Hz}$, $J_{7,8}=6.8\text{Hz}$, $J_{7,\text{F}}=14.0\text{Hz}$, H-7), 3.88 (ddd, 1H, $J_{9\text{a}9\text{b}}=13.3\text{Hz}$, $J_{9\text{a},8}=3.5\text{Hz}$, $J_{9\text{b},\text{F}}=28.0\text{Hz}$, H-9b), 3.86 (dd, 1H, $J_{5,6}=9.9\text{Hz}$, $J_{6,7}=\sim 0\text{Hz}$, H-6), 3.72 (ddd, 1H, $J_{9\text{a},9\text{b}}=5.33\text{Hz}$, $J_{9\text{a},8}=5.0\text{Hz}$, $J_{9\text{a},\text{F}}=30.6\text{Hz}$, H-9a), 2.28 (dd, 1H, $J_{3\text{eq},3\text{ax}}=13.00$, $J_{3\text{eq},4}=4.6\text{Hz}$, H-3eq), 2.05 (s, 3H, Ac), 1.87 (dd, 1H, $J_{3\text{ax},4}=11.1\text{Hz}$, $J_{3\text{eq},3\text{ax}}=13.00$, H-3ax)

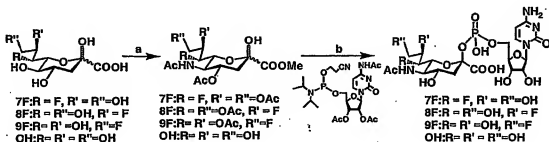
参考例 16 (5-アセタミド-3,5,9-トリデオキシ-9-フルオロ-D-グリセロ- β -D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (9-フルオロシアル酸))

5-Acetamide-3,5,9-trideoxy-9-fluoro-D-glycero- β -D-galacto-2-nonulopyranosidonic acid 28の合成)

- 下記のスキームに従ってシアル酸 (26) から 5-アセタミド-3,5,9-トリデオキシ-9-フルオロ-D-グリセロ- β -D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (28) を合成した。



参考例 17 CMP-シアル酸の合成



(a) (1) Dowex 50-X8, MeOH, (2) Ac₂O, 60% HCl
O₄;

(b) (1) 1H-Tetrazole, CH₃CN, (2) t-BuOOH,
CH₃CN, (3) DBU, CH₃CN, (4) NaOMe, MeOH, H₂O

シアル酸 (0.074 mmol) を蒸留メタノール (3 ml) に溶かし、アル
ゴン気流下室温で攪拌しながらDowex-50W-X8 (65 mg) を加え、
3 時間反応させた。反応終了を確認し、濾過後減圧濃縮した。残渣を無水酢酸
(200 μl) に溶かし、-20℃で攪拌しながら無水酢酸:60%過塩素酸=
15:1 溶液 (22 μl) を加え、10℃にて40分反応させた。反応終了を確認
後、反応溶液を酢酸エチルで希釈して、飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水
硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮して、カルボキシ基が保護された
シアル酸 (29) を含む残渣を得た。残渣とCMP-5'-ホスホロアミダイト
誘導体 (30) (0.23 mmol) をベンゼンで別々の3回共沸し、蒸留したア
セトニトリル (100 μl) にそれぞれ溶かし混ぜた。アルゴン気流下氷水中で
攪拌しながら1H-テトラゾール (17 mg, 0.23 mmol) を加えた。5

- 分後に室温に戻し、さらに10分間反応させた。反応終了を確認後、溶液を酢酸エチルで希釈し、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後30℃以下で濃縮した後さらにトルエンで2回共沸し水を取り除いた。残渣に蒸留したアセトニトリル(400 μ l)を加え、アルゴン気流下水冷しながら2.5Mのt-BuOOHToluen溶液(290 μ l)を滴下した。5分後に室温に戻し、さらに20分間攪拌した。反応終了を確認後、ジメチルスルフィド(53 μ l)を滴下し10分間攪拌してt-BuOOHをクエンチした。その後、DBU(18 μ l)を滴下して20分間室温で攪拌した。反応終了を確認後、メタノール(0.67 ml)、水(1.35 ml)、ナトリウムメトキシド(360 mg)を加え室温で16時間反応させた。反応終了を確認後水で抽出し、ジクロロメタンで洗浄した。水層を25℃以下で8ml程度まで減圧濃縮した。この水溶液をSephadex G-15(1.8 ϕ \times 90 cm)を用いるゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒: 20 mMアンモニア水、流速: 0.3 ml/min)で精製し、CMP-シアル酸を得た。

15 参考例18 CMP-7" -デオキシ-7" -フルオロ-シアル酸の合成

シアル酸の代わりに化合物(25)を用いた以外は参考例7と同様にしてCMP-7" -デオキシ-7" -フルオロ-シアル酸を合成した。NMRデータを以下に示す。

- ¹H-NMR(400 MHz, 50 mM ND₄DCO₃ in D₂O),
- 20 δ 8.04 (d, 1H, J_{5,6} = 7.6 Hz, H-6), 6.20 (d, 1H, J_{6,5} = 7.6 Hz, H-5), 6.06 (d, 1H, J_{1',2'} = 4.5 Hz, H-1'), 4.54 (dd, 1H, J_{7',8"} = 9.5 Hz, J_{7',F} = 45.9 Hz, H-7"), 4.42~4.20 (m, 7H, H-2', H-3', H-4', H-5' a, H-5' b, H-6", H-8"), 4.16 (ddd, 1H, J_{4',3"-eq} = 4.7 Hz, J_{4',3"-ax} = 11.3 Hz, J_{4,5} = 10.3 Hz, H-4"),
- 25 4.03 (dd, 1H, J_{5',4"} = J_{5",6"} = 10.3 Hz, H-5"), 3.91

(ddd, 1H, $J_{9''a, 9''b} = 12.2 \text{ Hz}$, $J_{9''a, 8''} = 2.8 \text{ Hz}$, $J_{9''a, F} = 2.8 \text{ Hz}$, H-9" a), 3.75 (ddd, 1H, $J_{9''a, 9''b} = 12.2 \text{ Hz}$, $J_{9''b, 8''} = 5.4 \text{ Hz}$, $J_{9''b, F} = 2.1 \text{ Hz}$, H-9" b), 2.61 (dd, 1H, $J_{3''eq, 4''} = 4.7 \text{ Hz}$, $J_{gem} = 13.3 \text{ Hz}$, H-3" eq), 2.14 (s, 3H, Ac), 1.76 (ddd, 1H, $J_{3''ax, 4''} = 11.5 \text{ Hz}$, $J_{gem} = 13.3 \text{ Hz}$, $J_{3''ax, F} = 5.6 \text{ Hz}$, H-3" ax),

参考例 19 CMP-8" -デオキシ-8" -フルオロ-シアル酸の合成

シアル酸の代わりに化合物 (27) を用いた以外は参考例 7 と同様にして CMP-8" -デオキシ-8" -フルオロ-シアル酸を合成した。NMR データを以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 50 mM ND_4DCO_3 in D_2O), δ 8.08 (d, 1H, $J_{5, 6} = 7.6 \text{ Hz}$, H-6), 6.20 (d, 1H, $J_{6, 5} = 7.6 \text{ Hz}$, H-5), 6.09 (d, 1H, $J_{1', 2'} = 4.1 \text{ Hz}$, H-1'), 4.90 (m, 1H, H-8"), 4.42 (dd, 1H, $J_{3', 2'} = 4.9 \text{ Hz}$, H-3'), 4.39 (dd, 1H, $J_{2', 1'} = 4.1 \text{ Hz}$, $J_{2', 3'} = 4.9 \text{ Hz}$, H-2'), 4.31-4.28 (m, 3H, H-4', H-5' a, H-5' b), 4.15 (ddd, 1H, $J_{4'', 3''eq} = 4.4 \text{ Hz}$, $J_{4'', 3''ax} = 11.5 \text{ Hz}$, $J_{4, 5} = 10.5 \text{ Hz}$, H-4"), 4.10-3.90 (m, 5H, H-5", H-6", H-7", H-9" a, H-9" b), 2.60 (dd, 1H, $J_{3''eq, 4''} = 4.4 \text{ Hz}$, $J_{gem} = 13.1 \text{ Hz}$, H-3" eq), 2.13 (s, 3H, Ac), 1.77 (ddd, 1H, $J_{3''ax, 4''} = 11.5 \text{ Hz}$, $J_{gem} = 13.1 \text{ Hz}$, $J_{3''ax, F} = 4.5 \text{ Hz}$, H-3" ax),

参考例 20 CMP-9" -デオキシ-9" -フルオロ-シアル酸の合成

シアル酸の代わりに化合物 (28) を用いた以外は参考例 7 と同様にして CMP-9" -デオキシ-9" -フルオロ-シアル酸を合成した。

実施例 1 Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジシアロ $\alpha 2$,

3糖鎖アスパラギン(C1-1)およびFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した2種のモノシアロ α 2,3糖鎖アスパラギン(C1-2及びC1-3)の合成

- 参考例3で得られたFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したアシアロ糖鎖アスパラギンにシアル酸転移酵素を用いてCMP-シアル酸を転移させた。

シアル酸転移酵素として α 2,3転移酵素である市販のRat, Recombinant由来のものを用いた。

- 参考例3で得られたアシアロ9糖(20mg, 10.1 μ mol)を50mM カコジル酸緩衝液(pH=6.0, 5ml)に溶解させた後、牛血清アルブミン(BSA, 5mg)を加える。これに、CMP-シアル酸(26mg, 40.4 μ mol)、Alkaline phosphatase(5 μ l, 125unit)を加え均一化する。最後に、 α 2,3-Sialyltransferase(CALBIOCHEM社製、100 μ l)を加え37℃で48時間静置させる。HPLCで反応をモニターしながら原料が目的量まで減少した時点で反応を終了させ、反応液をメンブランフィルターにて濾過する。濾液を濃縮し液量を減じた後、HPLC分取カラムにて精製した(YMC-Pack R&D ODS, D-ODS-5-A, 20 \times 250mm, AN/25mM AcONH₄ buffer=18/82, 7.5ml/min., wavelength; 274nm)ところ、25分後にジシアロ α 11糖化合物(C1-1)が、それぞれ30分後、34分後に各モノシアロ α 10糖化合物(C1-2)及び(C1-3)が溶出してきた。それぞれを分取した後、脱塩処理、次いで凍結乾燥を行うと、各化合物1、2、3がそれぞれ0.7mg(2.7%)、1.9mg(8.3%)、3.5mg(15.3%)得られた。各化合物のNMRデータは以下のとおりである。
- 化合物(C1-1)

^1H NMR (400MHz, D_2O , 30°C, $\text{HOD}=4.81$)

δ 7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49
(dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1
H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.91
5 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m, 4H), 4.34
(1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H2), 4.18 (bs,
1H, Man4-H2), 4.10 (m, 2H), 2.74 (m, 3H, Asn- β
CH, NeuAc7, 7'-H3eq), 2.40-2.60 (m, 1H, Asn
- β CH), 2.05, 2.03, 2.02 (each s, Ac), 1.77 (dd,
10 2H, NeuAc7, 7'-H3ax).

化合物 (C1-2)

^1H NMR (400MHz, D_2O , 30°C, $\text{HOD}=4.81$)

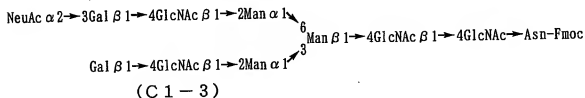
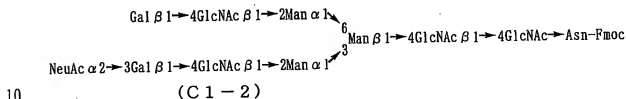
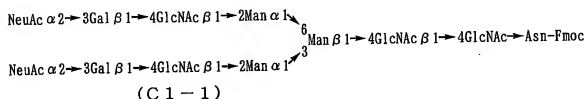
δ 7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49
(dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1
15 H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90
(s, 1H, Man4'-H-1), 4.47-4.60 (m), 4.43 (d, 1
H), 4.32 (1H, Fmoc), 4.22 (bs, 2H), 4.17 (bs, 1H,
Man4-H2), 4.06-4.13 (m, 2H), 2.72 (m, 2H, Asn
- β CH, NeuAc7-H3eq), 2.50-2.60 (m, 1H, Asn-
20 β CH), 2.05, 2.03, 2.01 (each s, Ac), 1.77 (dd,
1H, NeuAc7-H3ax).

化合物 (C1-3)

^1H NMR (400MHz, D_2O , 30°C, $\text{HOD}=4.81$)

δ 7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49
25 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1
H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90

(s, 1H, Man 4' -H-1), 4.50-4.60 (m), 4.45 (d, 1H), 4.33 (1H, Fmoc), 4.22 (m, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man 4-H2), 4.09 (m, 2H), 2.74 (m, 2H, Asn-βCH, NeuAc 7-H3eq), 2.45-2.60 (m, 1H, Asn-βCH),
 5 2.05, 2.03, 2.02, 2.00 (each s, Ac), 1.77 (dd, 1H, NeuAc 7-H3ax)



実施例 2

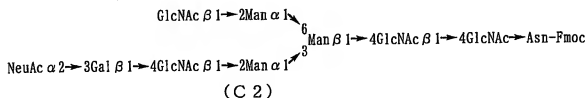
実施例 1 で得られた化合物 (C 1-2) (2mg, 0.88 μmol) とウシ血
 15 清アルブミン 1mg を HEPES 緩衝溶液 (50mM, pH 5.0) 100 μl
 に溶解させ、さらに β-ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans, 5 μL, 100 mU) を加えた。この溶液を 37℃ で 15 時間
 静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液を HPLC (ODS カ
 ラム、2.0 φ × 25 cm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : アセ

トニトリル＝８２：１８、流速 7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水 200 μ l に溶解させ ODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシール 75 C₁₈-open、最初に水で洗浄を行い、次いで 25% アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ

5 ろ、目的とする化合物 (C2) が $0.5 \mu\text{g}$ 得られた。NMR データは以下のとおりである。

 ^1H NMR (400MHz, D_2O , 30℃, HOD=4.81)

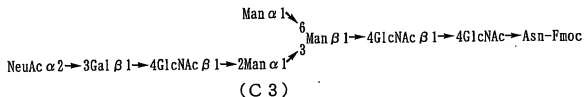
δ 7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49
 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1
 10 H, Man4-H1), 4.98 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90
 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m), 4.33 (1H,
 Fmoc), 4.22 (m, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man4-H2),
 4.10 (m, 2H), 2.74 (m, 2H, Asn- β CH, NeuAc7-H
 3eq), 2.45-2.60 (m, 1H, Asn- β CH), 2.05, 2.03,
 15 2.01 (each s, Ac), 1.78 (dd, 1H, NeuAc7-H3a
 x)



实施例 3

20 実施例2で得られた化合物(C2)(1.8mg, 0.86 μ mol)を、ウシ血清アルブミン1mgと共にHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0)90 μ lに溶解させ、さらにN-アセチル- β -グルコサミニダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans)を4 μ l(250mU)加えた。この溶液を37℃で24時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。

- ろ液をHPLC (ODSカラム、2.0φ×25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=82：18、流速7.5ml/min)で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200μlに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシール75C₁₈-open、
 5 最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる)を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物(C3)が0.9μg得られた。
¹H NMR (400MHz, D₂O, 30℃, HOD=4.81)
 δ 8.01 (d, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.80 (d, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.60 (dd, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.53 (dd,
 10 2H, J=7.6, Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man4-H1), 5.09 (d, 1H, J=8.8, GlcNAc1-H1), 5.00 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.87 (s, 1H), 4.60-4.78 (m, 5H), 4.40-4.50 (bm, 2H), 4.34 (s, 1H), 4.28 (bs, 1H, Man4-H2), 4.20 (dd, 1H, J_a=3.0, J_b=9.9), 2.80-
 15 2.95 (m, 2H, Asn-βCH, NeuAc7-H3eq), 2.65-2.75 (m, 1H, Asn-βCH), 2.16, 2.14, 2.12 (each s, Acx3), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.89 (dd, 1H, J_a=12.1, J_b=11.9, NeuAc7-H3ax).

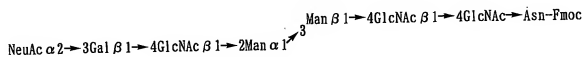


実施例4

実施例3で得られた化合物(C3)(0.8mg, 0.42μmol)とウシ血清アルブミン1mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0)50μlに溶解させ、α-マンノシダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from Jack

Beans) 30 μ l (2.9 U) 加えた。この溶液を 37℃ で 63 時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液を HPLC (ODS カラム、2.0 ϕ \times 25 cm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : アセトニトリル = 80 : 20、流速 7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水 200 μ l に溶解させ ODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシール 75 C₁₈-open、最初に水で洗浄を行い、次いで 25% アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C4) が 0.6 μ g 得られた。

¹H NMR (400 MHz, D₂O, 30°C, HOD = 4.81)
 10 δ 8.00 (d, 2H, J = 7.2, Fmoc), 7.79 (d, 2H, J = 7.2, Fmoc), 7.59 (dd, 2H, J = 7.2, Fmoc), 7.52 (d, 2H, J = 7.2, Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man4-H1),
 5.09 (d, 1H, J = 10.0, GlcNAc1-H1), 4.60-4.75 (m,), 4.40-4.50 (m, 2H), 4.32 (bd, 1H, J = 2.3),
 15 4.28 (bs, 1H), 4.22 (bdd, 1H, J_a = 9.7, J_b = 2.8, Man4-H2), 2.80-2.95 (m, 2H, Asn- β CH, NeuAc7-H3eq), 2.60-2.75 (m, 1H, Asn- β CH), 2.14, 2.14, 2.12 (each s, Ac \times 3), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.88 (dd, 1H, J_a = 12.1, J_b = 12.0, NeuAc7-H3ax) .



20

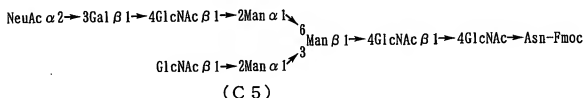
(C4)

実施例 5

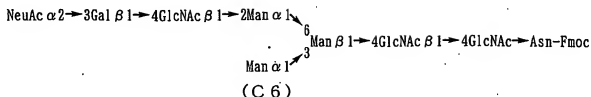
実施例 1 で得られた化合物 (C1-3) (1mg, 0.44 μ mol) とウシ血清アルブミン 1mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0) 50 μ l に

溶解させ、さらにβ-ガラクトシダーゼ（生化学工業社製、from Jack Beans, 5 μL, 100 mU）を加えた。この溶液を37℃で15時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC（ODSカラム、2.0 φ×25 cm、展開溶媒は50 mM 酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=82：18、流速7.5 ml/min）で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200 μlに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー（コスモシル75 C₁₈-open、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる）を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物（C5）が0.3 μg得られた。

- 10 ^1H NMR (400 MHz, D_2O , 30°C , $\text{HOD}=4.81$)
 δ 8.01 (d, 2H, $J=7.2$, Fmoc), 7.81 (d, 2H, $J=7.2$, Fmoc), 7.60 (dd, 2H, $J=7.2$, Fmoc), 7.53 (d, 2H, $J=7.2$, Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man4-H1),
5.09 (d, 1H, $J=9.6$, GlcNAc1-H1), 5.02 (s, 1H,
15 Man4'-H-1), 4.55-4.70 (m), 4.44 (1H, Fmoc),
4.30-4.38 (bm, 2H), 4.28 (bd, 1H, Man4-H2),
4.17-4.25 (m, 2H), 2.78-2.95 (m, 2H, Asn- βCH ,
NeuAc7-H3eq), 2.55-2.70 (m, 1H, Asn- βCH),
2.16, 2.15, 2.14, 2.12 (each s, 12H, Ac \times 4),
20 1.98 (s, 3H, Ac), 1.89 (dd, 1H, $J_a=12.2$, $J_b=12.0$, NeuAc7-H3ax).



- 実施例5で得られた化合物(C5)(1.0mg, 0.48 μ mol)を、ウシ血清アルブミン1mgと共にHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0)50 μ lに溶解させ、さらにN-アセチル- β -グルコサミニダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans)を4 μ l(250mU)加えた。
- 5 この溶液を37℃で22時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC(ODSカラム、2.0 ϕ ×25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=82:18、流速7.5ml/min)で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200 μ lに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー(コスモシール75C₁₈-open、
- 10 最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる)を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物(C6)が0.6 μ g得られた。
- ¹H NMR(400MHz, D₂O, 30℃, HOD=4.81)
- δ 8.01(d, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.80(d, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.60(dd, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.53(d
- 15 d, 2H, J=7.6, Fmoc), 5.19(s, 1H, Man4-H1), 5.09(d, 1H, J=9.2, GlcNAc1-H1), 5.02(s, 1H, Man4'-H-1), 4.85(s, 1H) 4.58-4.75(m, 5H), 4.38-4.48(m, 2H, Fmoc), 4.40(bd, J=2.4, 1H), 4.18-4.25(m, 2H), 4.15(m, 1H), 2.80-2.95(m,
- 20 2H, Asn- β CH, NeuAc7-H3eq), 2.65-2.75(m, 1H, Asn- β CH), 2.16, 2.13, 2.12(each s, 9H, Acx3), 1.98(s, 3H, Ac), 1.89(dd, 1H, Ja=12.2, Jb=12.0, NeuAc7-H3ax).

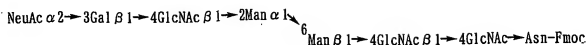


实施例 7

実施例 6 で得られた化合物 (C 6) (1.0 mg, 0.53 μ mol) とウシ血清アルブミン 1 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0) 50 μ l に溶解させ、 α -マンノシダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans) 10 μ l (0.9 U) を加えた。この溶液を 37 $^{\circ}$ C で 20 時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液を HPLC (ODS カラム、2.0 ϕ \times 25 cm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : アセトニトリル = 80 : 20、流速 7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水 200 μ l に溶解させ ODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシール 75 C₁₈-open、最初に水で洗浄を行い、次いで 25% アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C 7) が 0.5 μ g 得られた。

¹H NMR (400 MHz, D₂O, 30 °C, HOD=4.81)

δ 8.01 (d, 2H, $J=7.6$, Fmoc), 7.81 (d, 2H, $J=7.6$, Fmoc), 7.60 (dd, 2H, $J=7.2$, Fmoc), 7.53 (dd, 2H, $J=7.6$, Fmoc), 5.09 (d, 1H, $J=9.2$, GlcNAc1-H1), 5.01 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.84 (s, 1H), 4.55-4.70 (m, 5H), 4.44 (t, 1H, $J=6.0$, Fmoc), 4.30-4.38 (bs, 1H), 4.15-4.25 (m, 2H), 4.17 (s, 1H), 2.80-2.95 (m, 2H, Asn- β CH, NeuAc7-H3eq), 2.55-2.70 (m, 1H, Asn- β CH), 2.16, 2.13, 2.12 (eachs, Acx3), 1.98 (s, 3H, Ac) 1.89 (dd, 1H, $J_a=12.2$, $J_b=12.3$, NeuAc7-H3ax).



(C7)

実施例7A

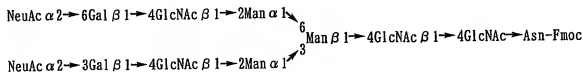
Fmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジシアロ ($\alpha 2, 6$) (α 2, 3) 糖鎖アスパラギンの合成

参考例3で得られたFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したアシアロ糖鎖アスパラギン (化合物2) にシアル酸転移酵素を用いてCMP-シアル酸を転移させた。

シアル酸転移酵素として $\alpha 2, 3$ 転移酵素である市販のRat, Recombinant由来のものを用いた。

参考例3で得られた化合物2 (1.7 mg, 0.75 μmol) を50 mMカコジル酸緩衝液 (pH=5.0, 85 μl) に溶解させた後、牛血清アルブミン (BSA, 1 mg) を加える。これに、CMP-シアル酸 (4.8 mg, 7.5 μmol)、Alkaline phosphatase (1 μl , 75 unit) を加え均一化する。最後に、 $\alpha 2, 3$ -Sialyltransferase (CALBIOCHEM社製、75 μl , 34 mU) を加え37℃で3.5時間静置させる。HPLCで反応をモニターしながら原料が消失した時点で反応を終了させ、反応液をメンブランフィルターにて濾過する。濾液を濃縮し液量を減じた後、HPLC分取カラムにて精製した (YMC-Pack R&D ODS, D-ODS-5-A, 20×250 mm, AN/25 mM AcONH₄ buffer=18/82, 7.5 ml/min., wave length; 274 nm) と、25分後に化合物 (C7A) が溶出してきた。分取した後、脱塩処理、次いで凍結乾燥を行うと、化合物 (C7A) が1.3 mg (67.8%) 得られた。化合物のNMRデータは以下のとおりである。

- ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 30°C, HOD=4.81)
- δ 8.00 (d, 2H, J=7.2, Fmoc), 7.79 (d, 2H, J=7.2, Fmoc), 7.60 (dd, 2H, J=7.2, Fmoc), 7.52 (d, 2H, J=7.2, Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man4-H1),
- 5 5.09 (d, 1H, J=8.8, GlcNAc1-H1), 5.03 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.86 (s, 1H), 4.58-4.72 (m, 5H), 4.54 (d, 1H, J=8.0), 4.38-4.48 (m, 2H) 4.34 (bs, 1H), 4.28 (bs, 1H), 4.15-4.25 (m, 2H), 2.80-2.86 (dd, 1H, J_a=4.4, J_b=12.4, NeuAc7-H3eq),
- 10 2.73-2.83 (m, dd, 3H, J_a=4.4, J_b=12.4, Asn-βCH, NeuAc7-H3eq), 2.60-2.72 (m, 1H, Asn-βCH), 2.16, 2.15, 2.14, 2.12 (each s, Ac x5), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.89 (dd, 1H, J_a=12.4, J_b=12.0, NeuAc7-H3ax), 1.81 (dd, 1H, J_a=12.4,
- 15 J_b=12.0, NeuAc7-H3ax).



実施例 7 B

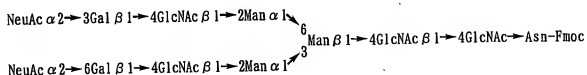
Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジシアロ (α2, 3) (α2, 6) 糖鎖アスパラギンの合成

- 20 参考例 3 で得られた Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したアシアロ糖鎖アスパラギン (化合物 3) にシアル酸転移酵素を用いて CMP-シアル酸を転移させた。

シアル酸転移酵素として α2, 3 転移酵素である市販の Rat, Recombinant 由来のものを用いた。

- 参考例3で得られた化合物3 (1.2 mg, 0.53 μ mol) を50 mM カコ
ジル酸緩衝液 (pH=5.0, 60 μ l) に溶解させた後、牛血清アルブミン
(BSA, 1 mg) を加える。これに、CMP-シアル酸 (3.4 mg, 5.3 μ
mol)、Alkaline phosphatase (1 μ l, 75 unit)
5 t) を加え均一化する。最後に、 α 2,3-Sialyltransferase
(CALBIOCHEM社製、52.9 μ l, 24 mU) を加え37℃で3時
間静置させる。HPLCで反応をモニターしながら原料が全て消費された時点で
反応を終了させ、反応液をメンブランフィルターにて濾過する。濾液を濃縮し液
量を減じた後、HPLC分取カラムにて精製した (YMC-Pack R&D
10 ODS, D-ODS-5-A, 20 \times 250 mm, AN/25 mM AcONH
4 buffer=18/82, 7.5 ml/min., wave length
h; 274 nm) ところ、23分後に化合物 (C7B) が溶出してきた。分取し
た後、脱塩処理、次いで凍結乾燥を行うと、各化合物 (C7B) が1.1 mg
(81.2%) 得られた。各化合物のNMRデータは以下のとおりである。
- 15 ^1H NMR (400 MHz, D_2O , 30℃, HOD=4.81)
 δ 8.00 (d, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.79 (d, 2H, J=
7.6, Fmoc), 7.59 (dd, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.51 (d
d, 2H, J=7.6, Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man4-H1),
5.08 (d, 1H, J=10.0, GlcNAc1-H1), 5.00 (s, 1H,
20 Man4'-H-1), 4.84 (s, 1H), 4.60-4.72 (m, 5H),
4.52 (d, 1H, J=7.6), 4.35-4.45 (m, 2H), 4.33 (b
s, 1H), 4.27 (bs, 1H), 4.15-4.25 (m, 2H), 2.80-
2.86 (dd, 1H, J_a=4.8, J_b=12.4, NeuAc7-H3eq),
2.73-2.83 (bs, dd, 3H, J_a=4.8, J_b=12.4,
25 Asn- β CH; NeuAc7-H3eq), 2.60-2.72 (m, 1H,
Asn- β CH), 2.15, 2.12, 2.10 (each s, Ac x5),

1.97 (s, 3H, Ac), 1.88 (dd, 1H, J a = 12.4, J b = 12.4, NeuAc 7-H3ax), 1.80 (dd, 1H, J a = 12.4, J b = 12.4, NeuAc 7-H3ax).



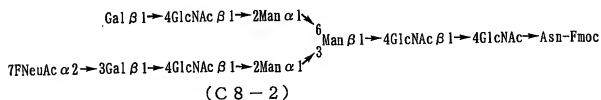
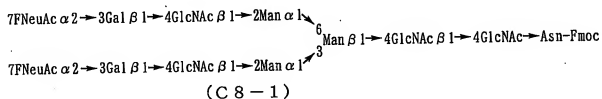
5

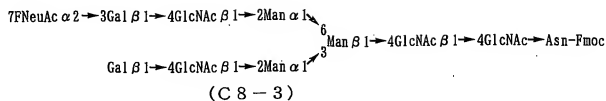
実施例 8 Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ"ーデオキシー"フルオローシアロ α 2,3糖鎖アスパラギン (C8-1) および Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した2種のモノ"ーデオキシー"フルオローシアロ α 2,3糖鎖アスパラギン (C8-2及びC8-3) の

10 合成

参考例 8 で得られた CMP-7"ーデオキシー"フルオローシアル酸を用いた以外は実施例 1 と同様にして下記に示す Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ"ーデオキシー"フルオローシアロ α 2,3糖鎖アスパラギンおよび Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した2種のモノ

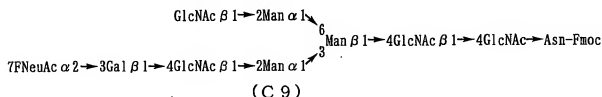
15 7"ーデオキシー"フルオローシアロ α 2,3糖鎖アスパラギンを得た。





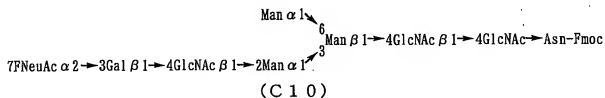
实施例 9

実施例2の化合物(C1-2)の代りに実施例8で得られた化合物(C8-2)を使用した以外は実施例2と同様にして目的とする化合物(C9)が得られた。



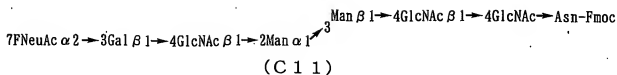
10 实施例 10

実施例 3 の化合物 (C 2) の代わりに実施例 9 で得られた化合物 (C 9) を使用した以外は実施例 3 と同様にして目的とする化合物 (C 10) が得られた。



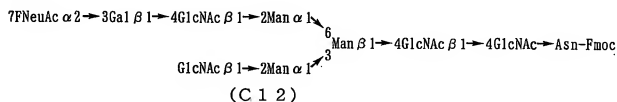
15 实施例 11

実施例 4 の化合物 (C 3) の代りに実施例 10 で得られた化合物 (C 10) を使用した以外は実施例 4 と同様にして目的とする化合物 (C 11) が得られた。



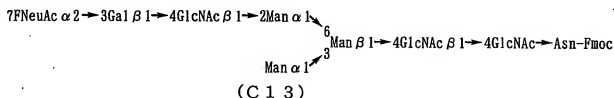
実施例 1 2

- 実施例 5 の化合物 (C 1 - 3) の代りに実施例 8 で得られた化合物 (C 8 - 3) を使用した以外は実施例 5 と同様にして目的とする化合物 (C 1 2) が得られた。



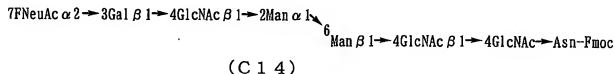
実施例 1 3

- 10 実施例 6 の化合物 (C 5) の代りに実施例 1 2 で得られた化合物 (C 1 2) を使用した以外は実施例 6 と同様にして目的とする化合物 (C 1 3) が得られた。



15 実施例 1 4

- 実施例 7 の化合物 (C 6) の代りに実施例 1 3 で得られた化合物 (C 1 3) を使用した以外は実施例 7 と同様にして目的とする化合物 (C 1 4) が得られた。

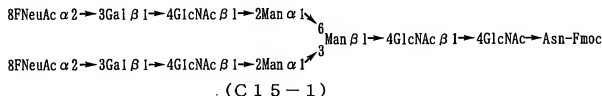


実施例 15 Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアロ α 2, 3 糖鎖アスパラギン (C15-1) および Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した 2 種のモノ 8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアロ α 2, 3 糖鎖アスパラギン (C15-2 及び C15-

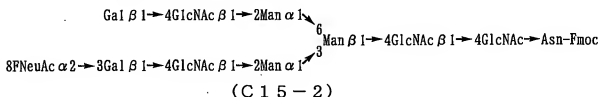
5 3) の合成

参考例 9 で得られた CMP-8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアル酸を用いた以外に、実施例 1 と同様にして下記に示す Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアロ α 2, 3 糖鎖アスパラギンおよび Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した 2 種のモノ

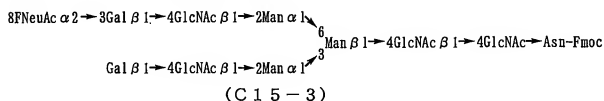
10 8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアロ α 2, 3 糖鎖アスパラギンを得た。



この糖鎖アスパラギンは式 (1) の $R^1=R^2=\text{式 (2)}$ 、 $R=\text{OH}$ 、 $R'=\text{F}$ 、 $R''=\text{OH}$ に相当する。



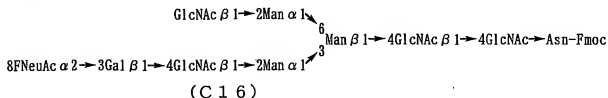
15 この糖鎖アスパラギンは式 (1) の $R^1=\text{式 (3)}$ 、 $R^2=\text{式 (2)}$ 、 $R=\text{OH}$ 、 $R'=\text{F}$ 、 $R''=\text{OH}$ に相当する。



この糖鎖アスパラギンは式 (1) の $R^1=\text{式 (2)}$ 、 $R=\text{OH}$ 、 $R'=\text{F}$ 、 $R''=\text{OH}$ 、 $R^2=\text{式 (3)}$ に相当する。

実施例 1 6 (実施例 1 5 のガラクトース加水分解酵素)

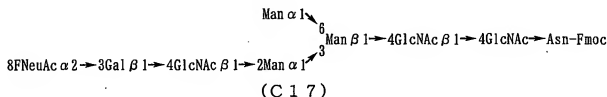
実施例 2 の化合物 (C 1 - 2) の代りに実施例 1 5 で得られた化合物 (C 1 5 - 2) を使用した以外は実施例 2 と同様にして目的とする化合物 (C 1 6) が得られた。



この糖鎖アスパラギンは式 (1) の $R^1 = \text{式 (4)}$ 、 $R^2 = \text{式 (2)}$ 、 $R = \text{OH}$ 、 $R' = \text{F}$ 、 $R'' = \text{OH}$ に相当する。

実施例 1 7 (実施例 1 6 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

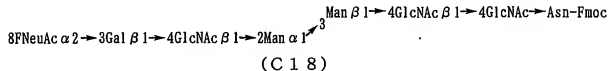
実施例 3 の化合物 (C 2) の代りに実施例 1 6 で得られた化合物 (C 1 6) を使用した以外は実施例 3 と同様にして目的とする化合物 (C 1 7) が得られた。



この糖鎖アスパラギンは式 (1) の $R^1 = \text{式 (5)}$ 、 $R^2 = \text{式 (2)}$ 、 $R = \text{OH}$ 、 $R' = \text{F}$ 、 $R'' = \text{OH}$ に相当する。

実施例 1 8 (実施例 1 7 のマンノース加水分解酵素)

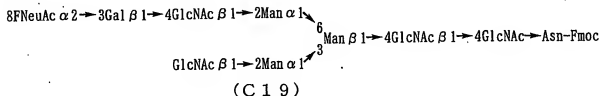
実施例 4 の化合物 (C 3) の代りに実施例 1 7 で得られた化合物 (C 1 7) を使用した以外は実施例 4 と同様にして目的とする化合物 (C 1 8) が得られた。



この糖鎖アスパラギンは式 (1) の $R^1 = \text{H}$ 、 $R^2 = \text{式 (2)}$ 、 $R = \text{OH}$ 、 $R' = \text{F}$ 、 $R'' = \text{OH}$ に相当する。

20 実施例 1 9 (実施例 1 5 のガラクトース加水分解酵素)

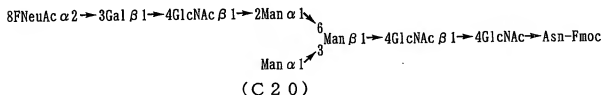
実施例 5 の化合物 (C1-3) の代わりに実施例 15 で得られた化合物 (C15-3) を使用した以外は実施例 5 と同様にして目的とする化合物 (C19) が得られた。



- 5 この糖鎖アスパラギンは式(1)の R^1 =式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=F$ 、 $R''=OH$ 、 R^2 =式(4)に相当する。

実施例 20 (実施例 19 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

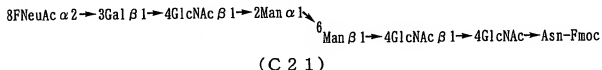
実施例 6 の化合物 (C 5) の代りに実施例 1 9 で得られた化合物 (C 1 9) を使用した以外は実施例 6 と同様にして目的とする化合物 (C 2 0) が得られた。



- この糖鎖アスパラギンは式(1)の R^1 =式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=F$ 、 $R''=OH$ 、 R^2 =式(5)に相当する。

実施例 21 (実施例 20 のマンノース加水分解酵素)

実施例 7 の化合物 (C 6) の代りに実施例 20 で得られた化合物 (C 20) を
15 使用した以外は実施例 7 と同様にして目的とする化合物 (C 21) が得られた。

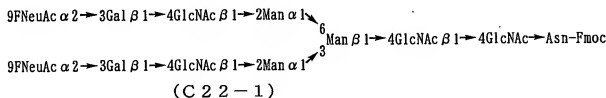


この糖鎖アスパラギンは式(1)の R^1 =式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=F$ 、 $R''=OH$ 、 $R^2=H$ に相当する。

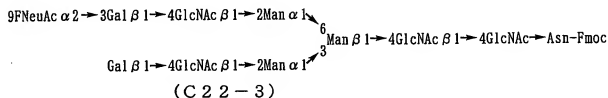
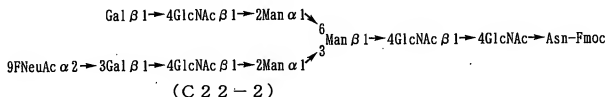
実施例 22 Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 9''-デオ

キシ-9"-フルオローシアロ α 2,3糖鎖アスパラギン(C22-1)およびFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した2種のモノ9"-デオキシ-9"-フルオローシアロ α 2,3糖鎖アスパラギン(C22-2及びC22-3)の合成

- 5 参考例10で得られたCMP-9"-デオキシ-9"-フルオローシアル酸を用いた以外は実施例1と同様にして上記Fmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ9"-デオキシ-9"-フルオローシアロ α 2,3糖鎖アスパラギンおよびFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した2種のモノ9"-デオキシ-9"-フルオローシアロ α 2,3糖鎖アスパラギンを得た。



10



15

(C22-1)は式(1)の $R^1=R^2=$ 式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=OH$ 、 $R''=F$ の糖鎖アスパラギンに相当する。

(C22-2)は式(1)の $R^1=$ 式(3)、 $R^2=$ 式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=OH$ 、 $R''=F$ の糖鎖アスパラギンに相当する。

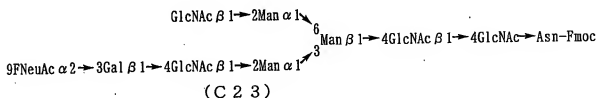
20 (C22-3)は式(1)の $R^1=$ 式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=OH$ 、 $R''=$

F、 R^2 =式(3)の糖鎖アスパラギンに相当する。

実施例 2 3 (実施例 2 2 のガラクトース加水分解酵素)

実施例 2 の化合物 (C 1 - 2) の代りに実施例 2 2 で得られた化合物 (C 2 2 - 2) を使用した以外は実施例 2 と同様にして目的とする化合物 (C 2 3) が得られた。

(C 2 3) は式 (1) の R^1 =式(4)、 R^2 =式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=O$ 、 H 、 $R''=F$ の糖鎖アスパラギンに相当する。

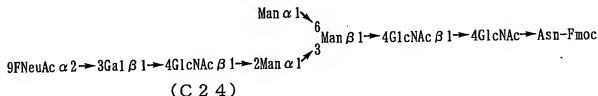


10

実施例 2 4 (実施例 2 3 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

実施例 3 の化合物 (C 2) の代りに実施例 2 3 で得られた化合物 (C 2 3) を使用した以外は実施例 3 と同様にして目的とする化合物 (C 2 4) が得られた。

(C 2 4) は式 (1) の R^1 =式(5)、 R^2 =式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=O$ 、 H 、 $R''=F$ の糖鎖アスパラギンに相当する。

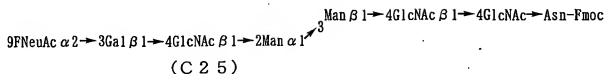


実施例 2 5 (実施例 2 4 のマンノース加水分解酵素)

実施例 4 の化合物 (C 3) の代りに実施例 2 4 で得られた化合物 (C 2 4) を使用した以外は実施例 4 と同様にして目的とする化合物 (C 2 5) が得られた。

(C 2 5) は式 (1) の $R^1=H$ 、 R^2 =式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=OH$ 、 $R''=F$ の糖鎖アスパラギンに相当する。

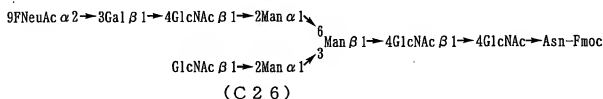
20



実施例 2 6 (実施例 2 2 のガラクトース加水分解酵素)

実施例 5 の化合物 (C 1 - 3) の代りに実施例 2 2 で得られた化合物 (C 2 2 - 3) を使用した以外は実施例 5 と同様にして目的とする化合物 (C 2 6) が得られた。

(C - 2 6) は式 (1) の $R^1 = \text{式 (2)}$ 、 $R = \text{OH}$ 、 $R' = \text{OH}$ 、 $R'' = \text{F}$ 、 $R^2 = \text{式 (4)}$ の糖鎖アスパラギンに相当する。

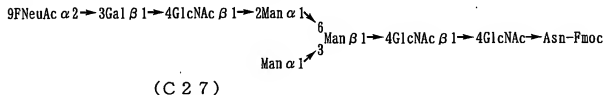


10

実施例 2 7 (実施例 2 6 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

実施例 6 の化合物 (C 5) の代りに実施例 2 6 で得られた化合物 (C 2 6) を使用した以外は実施例 6 と同様にして目的とする化合物 (C 2 7) が得られた。

(C 2 7) は式 (1) の $R^1 = \text{式 (2)}$ 、 $R = \text{OH}$ 、 $R' = \text{OH}$ 、 $R'' = \text{F}$ 、 $R^2 = \text{式 (5)}$ の糖鎖アスパラギンに相当する。

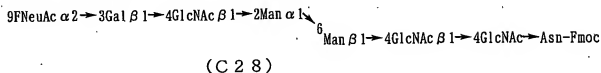


実施例 2 8 (実施例 2 7 のマンノース加水分解酵素)

実施例 7 の化合物 (C 6) の代りに実施例 2 7 で得られた化合物 (C 2 7) を

使用した以外は実施例 7 と同様にして目的とする化合物 (C 2 8) が得られた。

(C 2 8) は式 (1) の $R^1 = \text{式 (2)}$ 、 $R = \text{OH}$ 、 $R' = \text{OH}$ 、 $R'' = \text{F}$ 、 $R^2 = \text{H}$ の糖鎖アスパラギンに相当する。



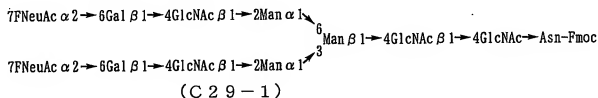
5

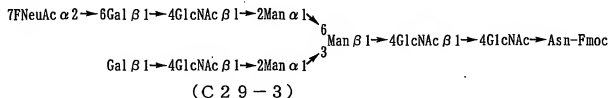
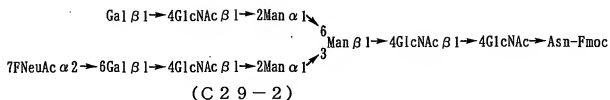
実施例 2 9 Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 7" - デオキシ- 7" - フルオロ- シアロ (2-6) 糖鎖アスパラギン (C 2 9-1) および Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した 2 種のモノ 7" - デオキシ- 7" - フルオロ- シアロ (2-6) 糖鎖アスパラギン (C 2 9-2 及び C 2 9-3) の合成

10

参考例 7 で得られた CMP-7" - デオキシ- 7" - フルオロ- シアル酸を、シアル酸転移酵素として $\alpha 2, 6$ 転移酵素である市販の Rat Liver 由来のものをを用い、カコジル酸緩衝溶液の pH を 6.0 とした以外は実施例 1 と同様にして下記に示す Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 7" - デオキシ- 7" - フルオロ- シアロ (2-6) 糖鎖アスパラギンおよび Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した 2 種のモノ 7" - デオキシ- 7" - フルオロ- シアロ (2-6) 糖鎖アスパラギンを得た。(C 2 9-1) ~ (C 2 9-3) の化学式を以下に示す。

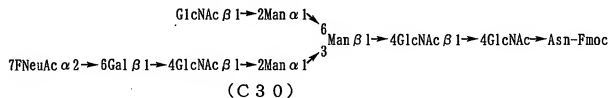
15





5 実施例 30 (実施例 29 のガラクトース加水分解酵素)

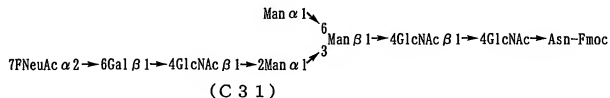
実施例 2 の化合物 (C 1 - 2) の代りに実施例 29 で得られた化合物 (C 29 - 2) を使用した以外は実施例 2 と同様にして目的とする化合物 (C 30) が得られた。(C 30) の化学式を以下に示す。



10

実施例 31 (実施例 30 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

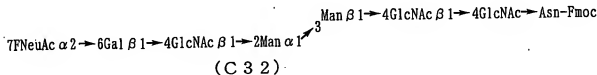
実施例 3 の化合物 (C 2) の代りに実施例 30 で得られた化合物 (C 30) を使用した以外は実施例 3 と同様にして目的とする化合物 (C 31) が得られた。(C 31) の化学式を以下に示す。



15

実施例 32 (実施例 31 のマンノース加水分解酵素)

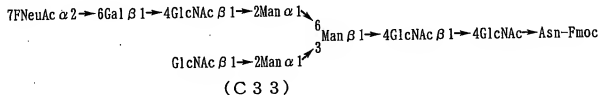
実施例 4 の化合物 (C 3) の代りに実施例 3 1 で得られた化合物 (C 3 1) を使用した以外は実施例 4 と同様にして目的とする化合物 (C 3 2) が得られた。(C 3 2) の化学式を以下に示す。



5

実施例 3 3 (実施例 2 9 のガラクトース加水分解酵素)

実施例 5 の化合物 (C 1 - 3) の代りに実施例 2 9 で得られた化合物 (C 2 9 - 3) を使用した以外は実施例 5 と同様にして目的とする化合物 (C 3 3) が得られた。(C 3 3) の化学式を以下に示す。

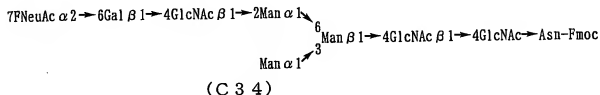


10

実施例 3 4 (実施例 3 3 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

実施例 6 の化合物 (C 5) の代りに実施例 3 3 で得られた化合物 (C 3 3) を使用した以外は実施例 6 と同様にして目的とする化合物 (C 3 4) が得られた。

15 (C 3 4) の化学式を以下に示す。

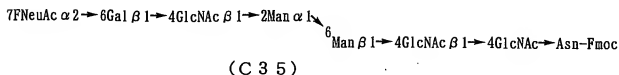


実施例 3 5 (実施例 3 4 のマンノース加水分解酵素)

実施例 7 の化合物 (C 6) の代りに実施例 3 4 で得られた化合物 (C 3 4) を

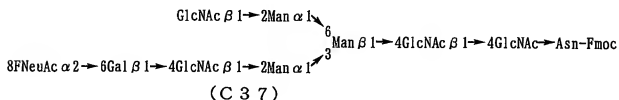
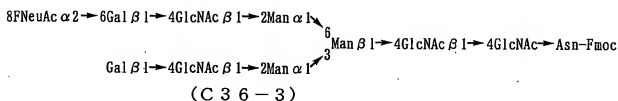
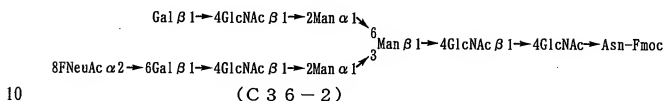
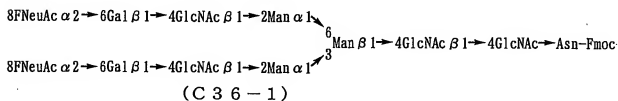
使用した以外は実施例 7 と同様にして目的とする化合物 (C 3 5) が得られた。

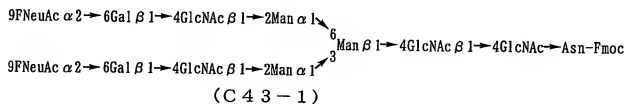
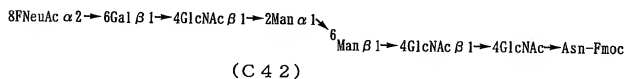
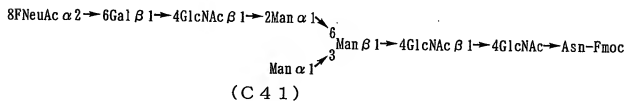
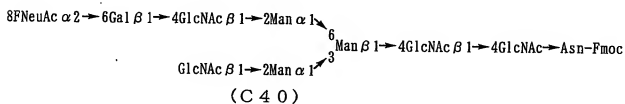
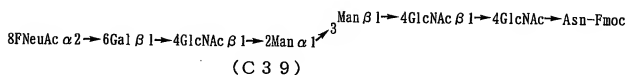
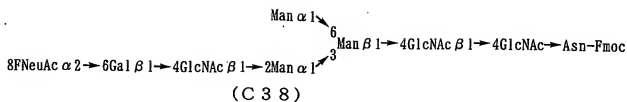
(C 3 5) の化学式を以下に示す。

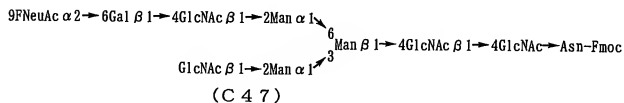
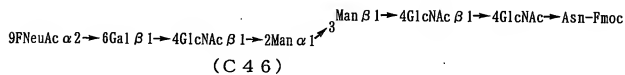
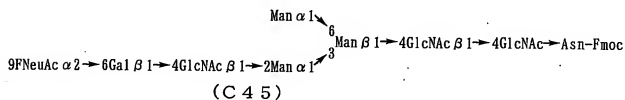
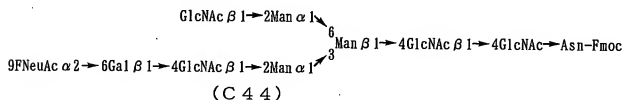
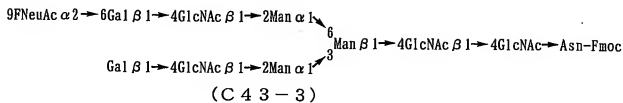
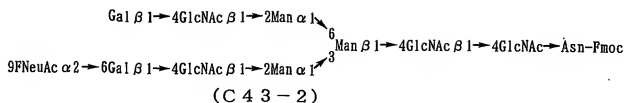


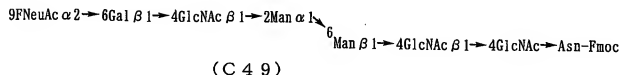
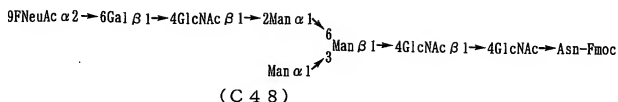
5 実施例 3 6 ~ 4 9

以下、同様にして以下に示す糖鎖アスパラギン誘導体を合成した。









- 5 尚、代表例として8F α 2, 6-11糖-Asn-Fmoc (C36-1)のNMRデータを以下に示す。

^1H NMR (400MHz, D_2O , 30°C, HOD=4.81)

- δ 8.01 (d, 2H, $J=7.4$, Fmoc), 7.80 (d, 2H, $J=7.4$, Fmoc), 7.59 (dd, 2H, $J=7.4$, Fmoc), 7.52 (b
 10 dd, 2H, $J=7.4$, Fmoc), 5.22 (s, 1H, Man4-H1), 5.08 (d, 1H, $J=9.4$, GlcNAc1-H1), 5.05 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.85-4.95 (m, 1H), 4.55-4.75 (m), 4.53 (d, 1H, $J=7.9$), 4.43 (m, 1H), 4.35 (bs, 2H, Man3-H2), 4.28 (bs, 1H, Man4-H2), 4.10-4.25
 15 (m, 2H), 2.75-2.85 (m, 1H, Asn- β CH), 2.63-2.70 (dd, 2H, $J_a=3.9$, $J_b=12.0$, NeuAc7, 7'-H3eq), 2.55-2.65 (m, 1H, Asn- β CH), 2.16, 2.11, 2.08 (eachs, 15H, Acx5), 1.84 (s, 3H, Ac), 1.74 (dd, 1H, $J_a=12.3$, $J_b=12.2$, NeuAc7-H3ax).
 20 実施例50 (糖鎖アスパラギン誘導体のFmoc基の脱保護)

全ての糖鎖アスパラギン誘導体において、以下の手順でFmoc基の脱保護を行った。まず、糖鎖アスパラギンFmoc体1 μmol あたりに240 $\mu\text{リット}$

ルのN,N-ジメチルホルムアミド、160 μ リットルのモルホリンを加え、室温・アルゴン雰囲気下で反応させた。TLC（展開溶媒として1M 酢酸アンモニウム：イソプロパノール＝8：5を用いた）にて反応終了を確認した後、氷水で冷却した。ここにジエチルエーテルを反応溶液の10倍量加えて15分間攪拌した後、析出した沈殿物をろ別した。得られた残渣を水に溶解させ、35℃でエバポレートした。更にトルエンを3ml加えエバポレートするという操作を3回繰り返した。残留物を逆相カラムクロマトグラフィー（コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm、展開溶媒は水）により精製して、対応する糖鎖アスパラギンを得た。

10 実施例51（糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基の除去）

実施例50で得られた糖鎖アスパラギンを無水ヒドラジンと反応させた後、アセチル化することによりアスパラギン残基を除去して対応する糖鎖を得た。

実施例52～69

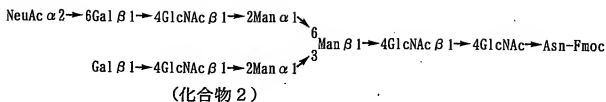
参考例2、3、8～13、実施例1～7で製造した各Fmoc-糖鎖アスパラ
15 ギン 2nmolを、トリス塩酸緩衝液 約10mlに溶解させた。このものに、
GDP-フコース 200nmol、Fucosyltransferase V (Human,
Recombinant) 0.5mUを加え、37℃で約2時間静置、反応させた。反応液を
超純水20mlで希釈したのち、キャピラリー電気泳動 (fused silica
capillary, 50mm i. d., 60cm, buffer; 100mM Tris-borate,
20 pH=8.3, 100mM Heptane sulfonate, 印加電圧27kV, 温度25℃,
214mm) で分離を行い各目的物を得た。

各実施例における原料及び目的物を以下に示す。

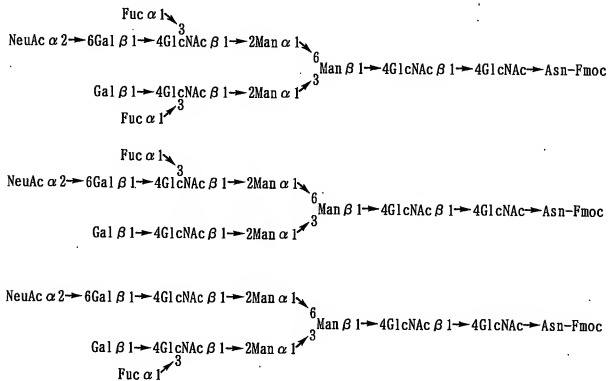
表 1

实施例 5 2

原料

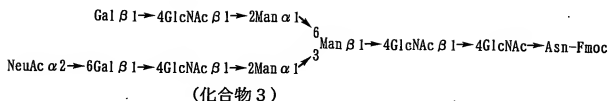


目的物



実施例 5 3

原料



目的物

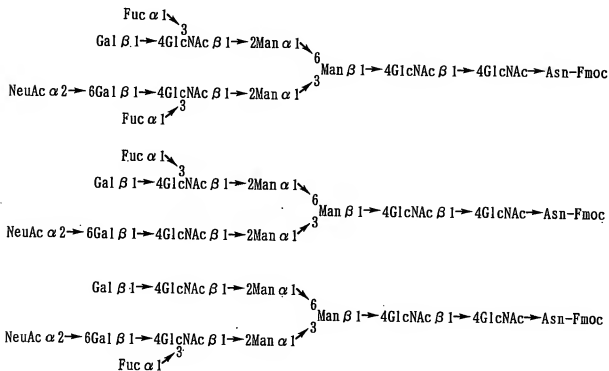
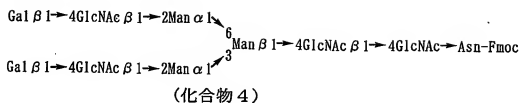


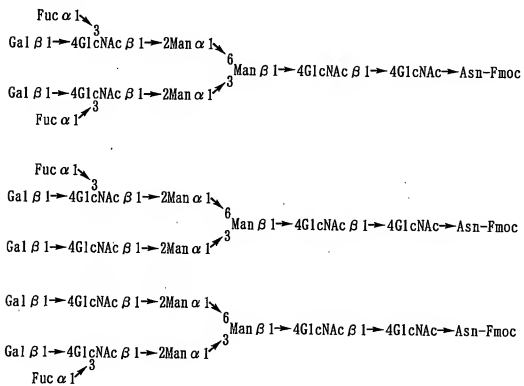
表 2

実施例 5 4

原料

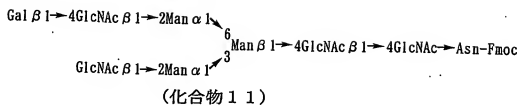


目的物

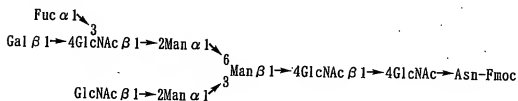


实施例 5 5

原料

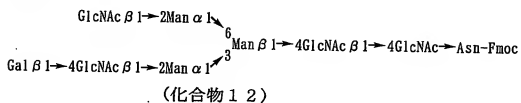


目的物

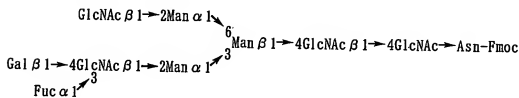


实施例 5 6

原料

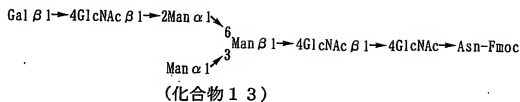


目的物

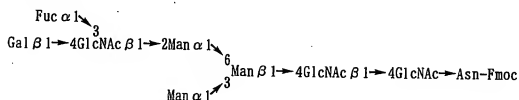


实施例 5 7

原料

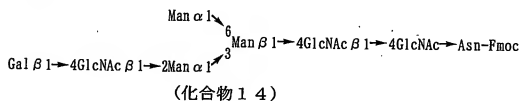


目的物

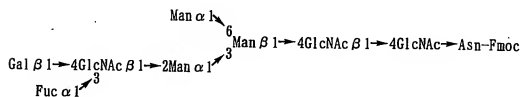


实施例 5 8

原料

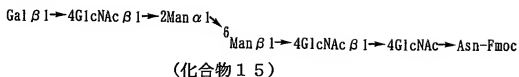


目的物

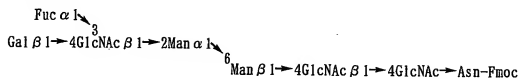


実施例 5 9

原料

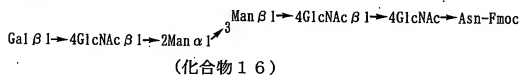


目的物

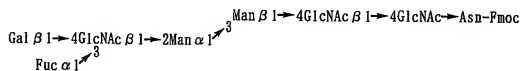


実施例 6 0

原料

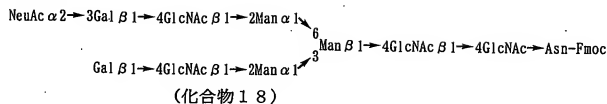


目的物



实施例 6 2

原料



目的物

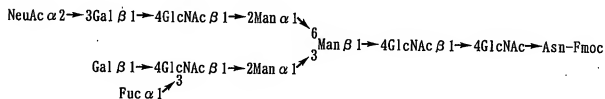
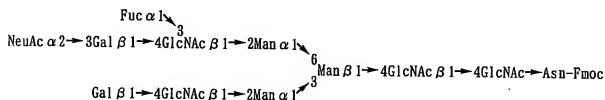
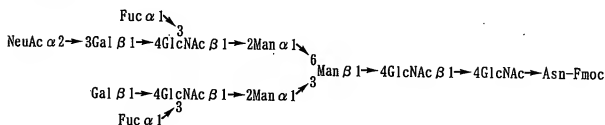
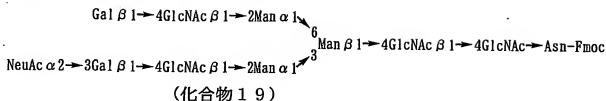


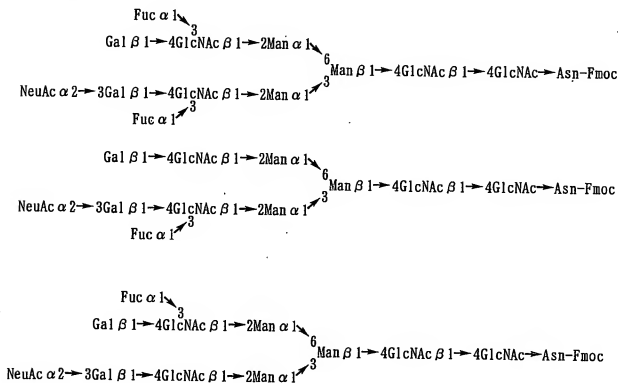
表 4

実施例 6 3

原料

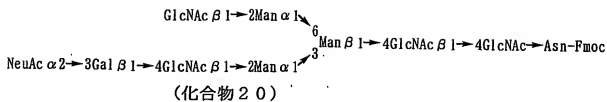


目的物

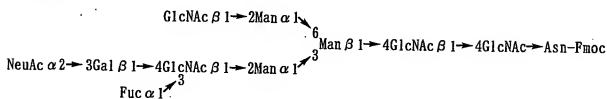


实施例 6 4

原料

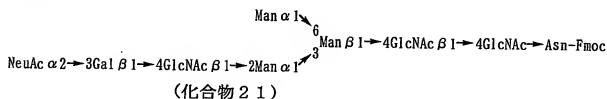


目的物

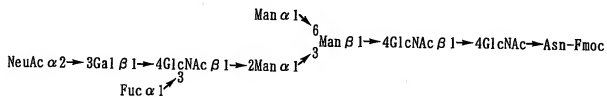


实施例 6 5

原料

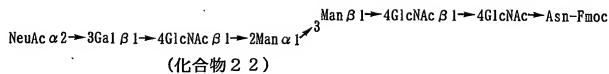


目的物

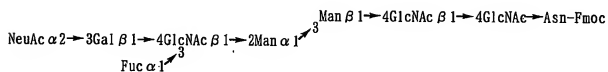


实施例 6 6

原料

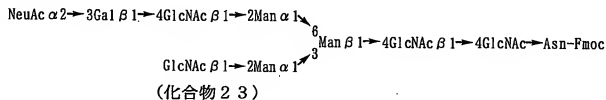


目的物

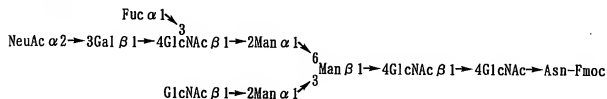


实施例 6 7

原料

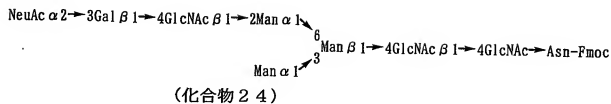


目的物

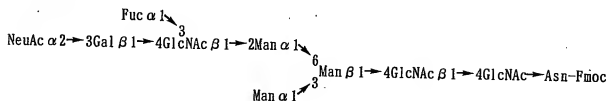


実施例 6 8

原料

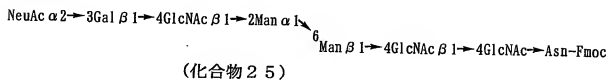


目的物

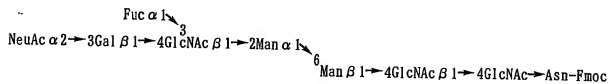


実施例 6 9

原料

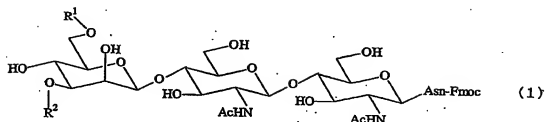


目的物

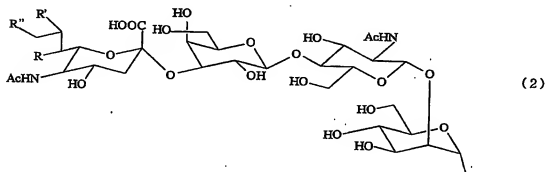


請求の範囲

1. 下記式(1)で表される11~7糖を有する α 2,3糖鎖アスパラギン誘導体。



[式中、 R^1 および R^2 は、水素原子、式(2)~(5)で示される基であり、同一でも異なってもよい。ただし、 R^1 および R^2 の一方は必ず式(2)で示される基である。]



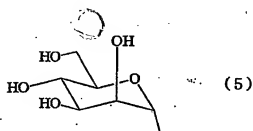
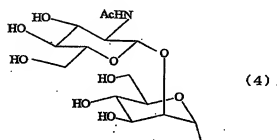
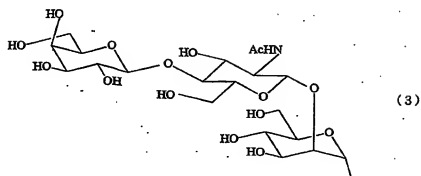
10 R, R', R'' は下記の組合せを示す。

(a) $R = F$, $R' = OH$, $R'' = OH$

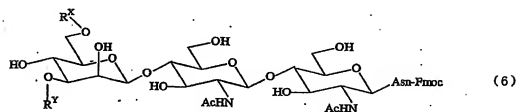
(b) $R = OH$, $R' = F$, $R'' = OH$

(c) $R = OH$, $R' = OH$, $R'' = F$

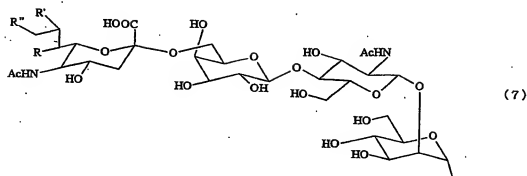
(d) $R = OH$, $R' = OH$, $R'' = OH$



- 5 2. 下記式(6)で表されるフッ素を含む11~7糖を有する α 2,6糖鎖アスパラギン誘導体。



[式中、 R^X および R^Y は、水素原子、式(7)で示される基、または式(3)~(5)で示される基である。ただし、 R^X および R^Y の一方は必ず式(7)で示される基である。]



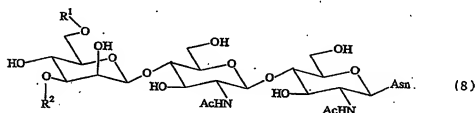
R, R', R'' は下記の組合せを示す。

(a) R=F, R' =OH, R'' =OH

(b) R=OH, R' =F, R'' =OH

5 (c) R=OH, R' =OH, R'' =F

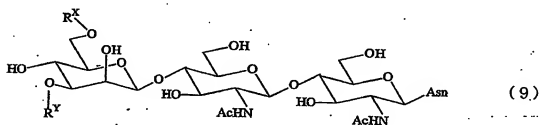
3. 下記式 (8) で表される 11~7 糖を有する α 2, 3 糖鎖アスパラギン。



[式中、R¹およびR²は上記に同じ。]

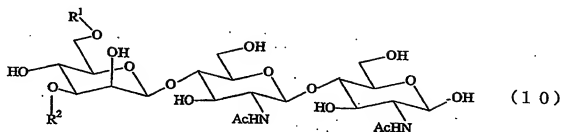
4. 下記式 (9) で表されるフッ素を含む 11~7 糖を有する α 2, 6 糖鎖アスパラギン。

10



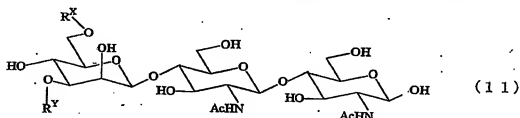
[式中、R^xおよびR^yは上記に同じ。]

5. 下記式 (10) で表される 11~7 糖を有する α 2, 3 糖鎖。



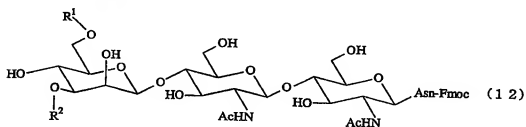
〔式中、 R^1 および R^2 は上記に同じ。〕

6. 下記式(11)で表されるフッ素を含む11~7糖を有する α 2,6糖鎖。



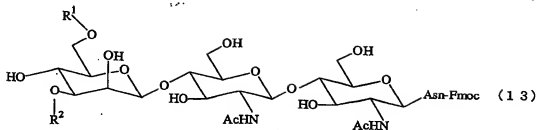
5 〔式中、 R^X および R^Y は上記に同じ。〕

7. 脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをシアル酸転移酵素を用いてシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離することとを特徴とする下記式(12)で表される11糖を有する α 2,3ジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



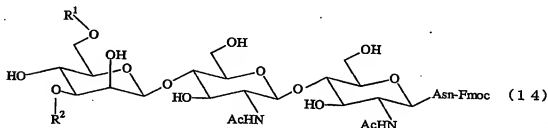
〔式中、 R^1 および R^2 は、共に式(2)で示される基である。〕

8. 脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをシアル酸転移酵素を用いてシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離することとを特徴とする下記式(13)で表される10糖を有する α 2,3モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



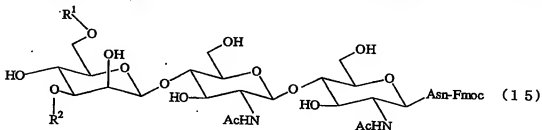
〔式中、 R^1 、 R^2 の一方は式(2)で示される基、他方は式(3)で示される基である。〕

9. 式(13)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をガラクトース加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(14)で表される9糖を有する α 2,3モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



〔式中、 R^1 、 R^2 の一方は式(2)で示される基、他方は式(4)で示される基である。〕

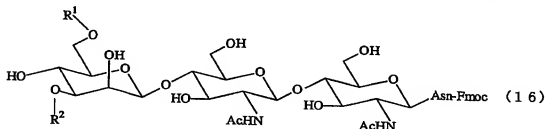
10. 10. 式(14)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をN-アセチルグルコサミン加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(15)で表される8糖を有する α 2,3モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



〔式中、 R^1 、 R^2 の一方は式(2)で示される基、他方は式(5)で示される基である。〕

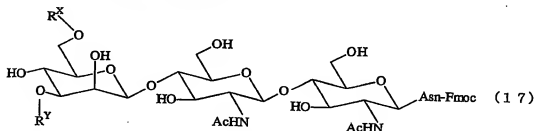
11. 式(15)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をマンノース

加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式 (16) で表される 7 糖を有する α 2, 3 モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



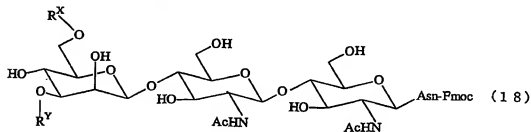
〔式中、 R^1 、 R^2 の一方は式 (2) で示される基、他方は水素原子である。〕

- 5 12. 脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをシアル酸転移酵素を用いてシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離することを特徴とする下記式 (17) で表される 11 糖を有する α 2, 6 ジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



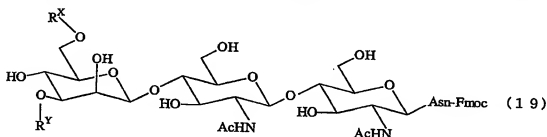
〔式中、 R^X および R^Y は、共に式 (7) で示される基である。〕

13. 脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをシアル酸転移酵素を用いてシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離する
15 ことを特徴とする下記式 (18) で表される 10 糖を有する α 2, 6 モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



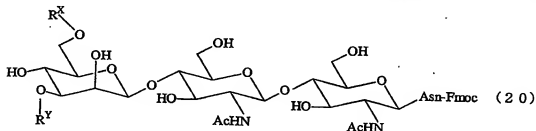
[式中、 R^x および R^y の一方は式(7)で示される基、他方は式(3)で示される基である。]

14. 式(18)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をガラクトース加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(19)で表される9糖を有する α 2,6モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



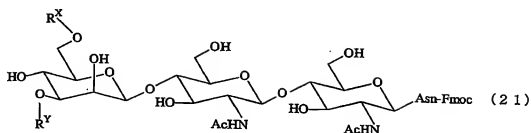
[式中、 R^x および R^y の一方は式(7)で示される基、他方は式(4)で示される基である。]

15. 式(19)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をN-アセチルグルコサミン加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(20)で表される8糖を有する α 2,6モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



[式中、 R^x および R^y の一方は式(7)で示される基、他方は式(5)で示される基である。]

16. 式(20)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をマンノース加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(21)で表される7糖を有する α 2,6モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



〔式中、 R^X および R^Y の一方は式(7)で示される基、他方は水素原子である。〕

17. 式(1)で表される11~7糖を有する α 2,3糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することを特徴とする式(8)で表される11~7糖を有する α

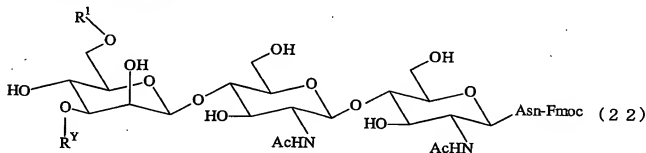
5 2,3糖鎖アスパラギンの製造法。

18. 式(6)で表される11~7糖を有する α 2,6糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することを特徴とする式(9)で表される11~7糖を有する α 2,6糖鎖アスパラギンの製造法。

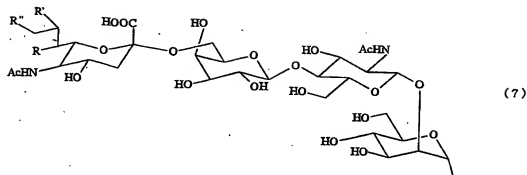
19. 式(8)で表される11~7糖を有する α 2,3糖鎖アスパラギンのアス
10 パラギン残基を除去することを特徴とする式(10)で表される11~7糖を有する α 2,3糖鎖の製造法。

20. 式(9)で表される11~7糖を有する α 2,6糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基を除去することを特徴とする式(11)で表される11~7糖を有する α 2,6糖鎖の製造法。

15 21. 下記式(22)で表される11糖を有する(α 2,3)(α 2,6)糖鎖アスパラギン誘導体。



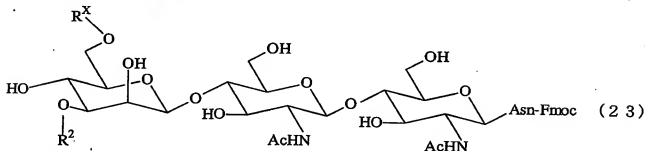
〔式中、 R^1 は式(2)で示される基であり、 R^Y は下記式(7)で示される基である。〕



R, R', R'' は下記の組合せを示す。

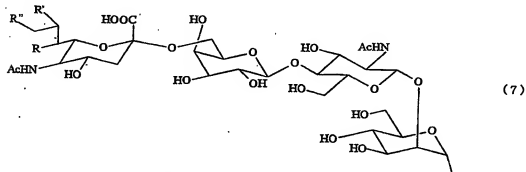
- 5 (a) $R=F$, $R'=OH$, $R''=OH$
 (b) $R=OH$, $R'=F$, $R''=OH$
 (c) $R=OH$, $R'=OH$, $R''=F$
 (d) $R=OH$, $R'=OH$, $R''=OH$

22. 下記式(23)で表される11糖を有する($\alpha 2, 3$)($\alpha 2, 6$)糖鎖アスパラギン誘導体。



〔式中、 R^2 は式(2)で示される基であり、 R^x は下記式(7)で示される基で

10 ある。]



R, R', R'' は下記の組合せを示す。

- (a) $R=F$, $R'=OH$, $R''=OH$
 (b) $R=OH$, $R'=F$, $R''=OH$

(c) $R=OH$, $R'=OH$, $R''=F$

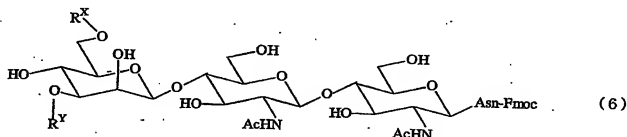
(d) $R=OH$, $R'=OH$, $R''=OH$

23. 脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

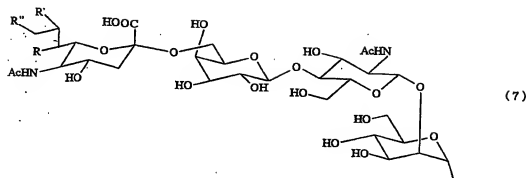
24. 脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンが、式(1)で表される11~7糖を有する α 2,3糖鎖アスパラギン誘導体である請求の範囲第23項に記載のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

25. 脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンが、式(6)で表されるフッ素を含む11~7糖を有する α 2,6糖鎖アスパラギン誘導体である請求の範囲第23項に記載のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

26. 脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンが、下記式(6)で表される11~6糖を有する α 2,6糖鎖アスパラギン誘導体である請求の範囲第23項に記載のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。



[式中、 R^X および R^Y は、水素原子、下記式(7)で示される基、または上記式(3)~(5)で示される基である。ただし、 R^X および R^Y の一方は必ず式(7)あるいは式(3)で示される基である。]



ただし、 $R=OH$ 、 $R'=OH$ 、 $R''=OH$ である。

27. 脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンをフコース転移酵素を用いてフコースを転移させ、得られた脂溶性の保護

5 基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離することを特徴とする脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16523

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl¹ C12P19/28, C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl¹ C12P19/28, C08B37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed, CA/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	HANEDA K., et al., Transglycosylation of intact sialo complex-type oligosaccharides to the N-acetylglucosamine moieties of glycopeptides by <i>Mucor hiemalis</i> endo- β -N-acetylglucosaminidase., Carbohydrate Research, October 1996, Vol.292, pages 61 to 70	1,7/2-6,8-27
X/Y	Unverzagt C., Building blocks for glycoproteins: synthesis of the ribonuclease B fragment 21-25 containing an Undecasaccharide N-glycan., Tetrahedron Letters, August 1997, Vol.38, No.32, pages 5627 to 5630	1/2-27
X/Y	Unverzagt C., Chemoenzymatic synthesis of a sialylated diantennary N-glycan linked to asparagine., Carbohydrate Research, December, 1997, Vol.305, pages 423 to 431	3/1-2,4-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 March, 2004 (23.03.04)

Date of mailing of the international search report
13 April, 2004 (13.04.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16523

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Yasuhiro KAJIWARA et al., "Asparagine ni Ketsugo shita 2bunki Fukugogata Tosa Yudotai no Gosei to NMR ni yoru Kozo Kaiseki", Dai 22 Kai The Japanese Society of Carbohydrate Research Nenkai Yoshishu, 02 July, 2001 (02.07.01), page 33	3/1-2, 4-27
X/Y	Lin CH., et al., Enzymatic synthesis of a sialyl Lewis X dimer from egg yolk as an inhibitor of E-selectin., Bioorganic and Medicinal Chemistry, December, 1995, Vol.3, No.12, pages 1625 to 1630	3/23-27
Y	Inazu T. et al., Preparation of Fmoc-asparagine derivatives having natural N-linked oligo saccharide, and its applicatoin to the synthesis of glycopeptides., Peptide Science, 1999, Vol.1998, pages 153 to 156	7-20, 27
Y	JP 2000-169503 A (Seikagaku Corp.), 20 June, 2000 (20.06.00), Pages 24 to 32 (Family: none)	1-22
Y	US 5908766 A (Japan Tobacco Inc.), 01 June, 1999 (01.06.99), & JP 08-173182 A	7-20
Y	JP 08-9989 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 16 January, 1996 (16.01.96), (Family: none)	7-20
Y	JP 2002-45196 A (Toyobo Co., Ltd.), 12 February, 2002 (12.02.02), (Family: none)	7-20
Y	Edited by The Japanese Biochemical Society, "Shin Seikagaku Jikken Koza (Dai 3 Kan), Toshitsu I To-Tanpakushitsu (Jo)", Tokyo Kagaku Dojin, 21 May, 1990 (21.05.90), pages 312 to 349	7-20
P,X	WO 03/008431 A1 (KAJIWARA Yasuhiro), 30 January, 2003 (30.01.03), & JP 2003-128703 A	1, 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16523

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claim 1 and Claim 23 are common in "a sugar chain asparagine in which the amino-group nitrogen of the asparagine has been protected by a lipid-soluble protective group". However, this point was known before the priority date for this application because "a sugar chain asparagine in which the amino-group nitrogen of the Fmoc-protected asparagine has been protected" is described in *Carbohydrate Research*, Vol.292, pp.61-70.

Consequently, claim 1 and claim 23 are not considered to contribute as a whole to the prior art. They have no technical relationship involving one or more, identical or corresponding special technical features. It is hence (continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16523

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

not considered that they are so linked as to form a single general inventive concept.

Therefore, "claims 1-22" and "claims 23-27" each is regarded as one invention. The number of inventions disclosed in this application is hence considered to be "2".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12P19/28, C08B37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 特許分類 (IPC)

Int. Cl. C12P19/28, C08B37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed,
CA/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Haneda K, et al. Transglycosylation of intact sialo complex-type oligosaccharides to the N-acetylglucosamine moieties of glycopeptides by <i>Mucor hiemalis</i> endo- β -N-acetylglucosaminidase. Carbohydrate Research, October 1996, Vol.292, p.61-70	1, 7/2-6, 8-27
X/Y	Unverzagt C. Building blocks for glycoproteins: synthesis of the ribonuclease B fragment 21-25 containing an Undecasaccharide N-glycan. Tetrahedron Letters, August 1997, Vol.38, No.32, p.5627-5630	1/2-27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 03. 2004

国際調査報告の発送日

13. 4. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JIP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

4B

9349

電話番号

03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Unverzagt C. Chemoenzymatic synthesis of a sialylated diantennary N-glycan linked to asparagine. Carbohydrate Research, December 1997, Vol.305, p.423-431	3/1-2, 4-27
X/Y	梶原康宏他, アスパラギンに結合した2分岐複合型糖鎖誘導体の合成とNMRによる構造解析, 第22回日本糖質学会年会要旨集, 2001. 07. 02, p. 33	3/1-2, 4-27
X/Y	Lin CH, et al. Enzymatic synthesis of a sialyl Lewis X dimer from egg yolk as an inhibitor of E-selectin. Bioorganic and Medicinal Chemistry, December 1995, Vol.3, No.12, p.1625-1630	3/23-27
Y	Inazu T, et al. Preparation of Fmoc-asparagine derivatives having natural N-linked oligosaccharide, and its application to the synthesis of glycopeptides. Peptide Science, 1999, Vol.1998, p.153-156	7-20, 27
Y	J P 2 0 0 0 - 1 6 9 5 0 3 A (生化学工業株式会社) 2000. 06. 20, p. 24-32 (ファミリーなし)	1-22
Y	US 5 9 0 8 7 6 6 A (Japan Tobacco Inc.) 1999. 06. 01 & J P 0 8 - 1 7 3 1 8 2 A	7-20
Y	J P 0 8 - 9 9 8 9 A (明治乳業株式会社) 1996. 01. 16 (ファミリーなし)	7-20
Y	J P 2 0 0 2 - 4 5 1 9 6 A (東洋紡績株式会社) 2002. 02. 12 (ファミリーなし)	7-20
Y	社団法人日本生化学会編, 新生化学実験講座 (第3巻) 糖質 I 糖タンパク質 (上), 東京化学同人, 1990. 05. 21, p. 312-349	7-20
PX	WO 0 3 / 0 0 8 4 3 . 1 A 1 (KAJIWARA Yasuhiro) 2003. 01. 30 & J P 2 0 0 3 - 1 2 8 7 0 3 A	1, 3

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1と請求の範囲23は、「脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギン」という点で共通しているものの、Carbohydrate Research, Vol.292, p.61-70には、「Fmocで保護されたアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギン」が記載されており、上記の点は、本願優先日前に公知である。

よって、請求の範囲1と請求の範囲23に係る発明は、全体として先行技術に対して行う貢献があるとは認められず、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるとはいえないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

したがって、「請求の範囲1-22」及び「請求の範囲23-27」がそれぞれ1発明と認められるから、本出願に係る発明の数は「2」と認める。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。